

Universidade Nova de Lisboa  
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Produção de Biohidrogénio pela cianobactéria  
*Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes**

**Efeito do ciclo de luz (dia/noite) e da intensidade luminosa**

**Ana Teresa Perdigão Barbosa**

**Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia  
da Universidade Nova de Lisboa para a obtenção de  
Grau de Mestre em Energia e Bioenergia**

**Orientadora: Doutora Luísa Gouveia (Investigadora Auxiliar LNEG)  
Co-Orientadora: Professora Doutora Benilde Mendes**

**Monte da Caparica  
Outubro, 2009**

Outubro, 2009

## FICHA TÉCNICA

Título: Produção de Biohidrogénio pela cianobactéria *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes. Efeito do ciclo de luz (dia/noite) e da intensidade luminosa.

Autor: Ana Teresa Perdigão Barbosa

Objectivo do presente trabalho: Dissertação apresentada à Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, para a obtenção do grau de Mestre em Energia e Bioenergia.

Âmbito do estudo: Estudo da produção de biohidrogénio a partir da cianobactéria *Anabaena* sp. PCC 7120 e suas mutantes: *hupL*<sup>-</sup>, *hoxH*<sup>-</sup>, *hupL*<sup>-</sup>/*hoxH*<sup>-</sup>, nas condições de luz contínua ou ciclos de luz/escuro, ou sob duas diferentes intensidades luminosas.

Orientador: Doutora Luísa Gouveia (Investigadora Auxiliar LNEG)

Co-Orientador: Professora Doutora Benilde Mendes

Contactos do autor: ana\_portoghesa@yahoo.it

Local: Monte da Caparica

Data: Outubro, 2009

O conteúdo da presente dissertação é da inteira responsabilidade do autor.

Não é autorizada a cópia, total ou parcial, do conteúdo da presente dissertação. É autorizada a citação do conteúdo da presente dissertação, desde que acompanhada da respectiva referência bibliográfica, de acordo com as normas internacionais de citação de trabalhos científicos.

## **Agradecimentos**

Além de agradecer à instituição LNEG, enquanto entidade que me proporcionou desenvolver esta dissertação e inserir num projecto inovador, gostaria de agradecer de forma muito sincera:

À Doutora Luísa Gouveia, Investigadora Auxiliar do LNEG, pela sua orientação, apoio, motivação e positivismo, que sempre com um sorriso, me acolheu neste projecto inovador e dinâmico. Agradeço-lhe também por me ter proporcionado a oportunidade de me inserir no seio da comunidade científica.

À Professora Doutora Benilde Mendes, pela sua co-orientação, disponibilidade e grande dinamismo. Por ouvir com interesse e ânimo todas as minhas questões e problemas que surgiram durante este trabalho.

À Ana Marques, bolseira do LNEG, minha companheira de laboratório, pela motivação, ajuda, positivismo. Pelas óptimas discussões, sempre enriquecedoras, pela amizade e pelas “ofertas”.

À Joana, minha companheira neste estudo, pela sua ajuda, boa disposição e imprescindível presença.

A toda a equipa que comigo trabalhou no LNEG durante estes meses e que contribuíram para que a parte prática desta dissertação pudesse ser realizada.

Ao Professor Nuno Lapa, Professor Auxiliar da UNL-FCT, pela sua disponibilidade na transmissão de informações e conhecimentos, e pelas sugestões fornecidas.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio, optimismo e ajuda nomeadamente nas correcções, adaptações, traduções e nesta panóplia de verbos que ajudaram a construir este trabalho. Agradeço-lhes também por estarem sempre presentes.

## Resumo

O hidrogénio é o elemento químico mais abundante no Universo, o mais leve e o que contém o maior valor energético. É promissor enquanto fonte energética, apesar de actualmente, quase todo ser produzido através de combustíveis fósseis. Como alternativa, surgem as energias renováveis, entre elas a produção fotobiológica de hidrogénio, a partir de micorganismos como as cianobactérias, que se encontram entre os candidatos ideais pelas simples necessidades nutricionais.

Nestes organismos existem três tipos de enzimas envolvidas no metabolismo do hidrogénio:

1. Nitrogenase, que cataliza a redução de  $N_2$  a  $NH_4^+$  com libertação de  $H_2$ . Este complexo requer um consumo energético elevado;
2. Hidrogenase de assimilação que recicla o  $H_2$  libertado pela nitrogenase;
3. Hidrogenase bi-direccional que pode funcionar no sentido da produção ou consumo de  $H_2$ .

É necessária a produção/selecção de mutantes deficientes na actividade de assimilação do  $H_2$ . Neste sentido, esta dissertação pretendeu estudar a cianobactéria *Anabaena* sp. PCC 7120 e os mutantes (*hupL*<sup>-</sup>, *hoxH*<sup>-</sup>, *hupL*<sup>-</sup>/*hoxH*<sup>-</sup>) sob diversas condições experimentais numa tentativa de maximizar a produção de hidrogénio.

Nas condições experimentais estudadas destacou-se sempre com maiores produções de hidrogénio, a estirpe *hupL*<sup>-</sup> atingindo um máximo de 20  $\mu\text{mol } H_2.\text{mg Chl } a^{-1}.\text{h}^{-1}$  com intensidade luminosa de 152  $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

**PALAVRAS-CHAVE:** Cianobactéria, *Anabaena* sp. PCC 7120, Hidrogénio, Nitrogenase, Hidrogenase.

## Abstract

Hydrogen is the lightest and the most abundant element in the universe, and the one with the highest heating value. Nowadays, despite being a relevant solution as an energy carrier,  $H_2$  is mainly produced from fossil fuels, but it can also be produced from renewable sources. This can be achieved by the exploitation of the photobiological processes in which cyanobacteria are among the ideal candidates, since they have the simplest nutritional requirements.

Cyanobacteria possess several enzymes directly involved in hydrogen metabolism:

1. Nitrogenase, catalyzing the reduction of  $N_2$  to  $NH_4^+$  and evolving  $H_2$ . This complex requires a high energy consumption.
2. Uptake hydrogenase, catalyzing the consumption of  $H_2$  produced by the nitrogenase.
3. Bi-directional hydrogenase, which has the dual capacity to take up and produce  $H_2$ .

It's necessary to select mutants without the consumption capacity. This thesis aimed to study the cyanobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 and mutants (*hupL*<sup>-</sup>, *hoxH*<sup>-</sup>, *hupL*<sup>-</sup>/*hoxH*<sup>-</sup>), under different experimental conditions, in order to maximize and make photobiological  $H_2$  production successful.

According to the conditions studied, the *hupL*<sup>-</sup> mutant was the best producer, reaching a maximum of  $20 \mu\text{mol } H_2.\text{mg Chl } a^{-1}.\text{h}^{-1}$  with a light intensity of  $152 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

**KEYWORDS:** Cyanobacterium, *Anabaena* sp. PCC 7120, Hydrogen, Nitrogenase, Hydrogenase.

## Simbologia e Notações

$\mu\text{E.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  – micro Einstein por metro quadrado por segundo

ADN - Ácido desoxirribonucleico

atm – atmosferas

ATP – Adenosina Tri-Fosfato

BTU - *British Thermal Unit*

Cit - Citocromo

$\text{C}_x\text{H}_x$  – Hidrocarbonetos

$\text{C}_2\text{H}_2$  - Acetileno

$\text{CH}_4$  - Metano

$\text{CH}_2\text{O}$  – Hidratos de Carbono

cm – centímetro

$\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$  – centímetro quadrado por segundo

CO – Monóxido de Carbono

$\text{CO}_x$  – Óxidos de Carbono

$\text{CO}_2$  – Dióxido de Carbono

COST - *European Cooperation in Science and Technology*

Chl a – Clorofila a

DO – Densidade óptica

$\text{DO}_0$  – Densidade óptica no tempo zero

EUA – Estados Unidos da América

DOE – *American Department of Energy*

FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia

Fd – Ferredoxina

Fe - Ferro

GJ - GigaJoule

$\text{GJ.ano}^{-1}$  – GigaJoule por ano

$\text{g.L}^{-1}$  – grama por litro

h - hora

$\text{H}_2$  – Hidrogénio

$\text{H}_2\text{O}$  – Água

$\text{H}_2\text{S}$  – Ácido Sulfídrico

HCN – Cianeto de Hidrogénio

$\text{HNO}_3$  – Ácido Nítrico

I&D – Investigação e Desenvolvimento

IPCC - *Intergovernmental Panel on Climate Change*

K - kelvin

kg - quilograma

$\text{kg.m}^{-3}$  – quilograma por metro cúbico

$\text{kg.Nm}^{-3}$  – quilograma por Newton metro cúbico

kJ – KiloJoule

Km – Constante de afinidade

KOH – Hidróxido de Potássio

kW – Kilowatt

kWh – Kilowatt hora

$\text{kWh.kg}^{-1}$  – Kilowatt hora por quilograma

$\text{kWh.m}^{-2}\text{dia}^{-1}$  – Kilowatt hora por metro quadrado por dia

L – litro

LHP – *Light Harvesting Pigments*

LNEG – Laboratório Nacional de Energia e Geologia  
 $m^2$  – metro quadrado  
 $m^2.ano^{-1}$  – metro quadrado por ano  
 $m^3.ano^{-1}$  – metro cúbico por ano  
 $Mg^{2+}$  - Ião Magnésio  
 $MJ.kg^{-1}$  – MegaJoule por quilograma  
ml – mililitro  
Mo - Molibdénio  
MPa - Megapascal  
 $mW.cm^{-1}K^{-1}$  – Miliwatt por centímetro kelvin  
 $N_2$  – Azoto molecular  
NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina  
 $NH_3$  - Amoníaco  
 $NH_4^+$  - Ião Amónio  
Ni - Níquel  
nm - Nanómetros  
 $Na^+$  - Sódio  
 $NO_x$  – Nitratos  
 $N_2O$  – Óxido nitroso  
 $O_2$  - Oxigénio  
PEMFC - *Proton exchange membrane fuel cell*  
Pi – Grupo Fosfato  
PJ - Petajoule  
 $PJ.ano^{-1}$  – Petajoule por ano  
 $PS_0$  – Peso seco no tempo zero  
PS – fotossistema  
PVTMS - Poliviniltrimetilsilano  
RuBisCo – ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase oxigenase  
S - Enxofre  
 $SO_x$  - Sulfatos  
UE-25 – União Europeia dos 25 países<sup>1</sup>  
US – *United States*

---

<sup>1</sup> Bélgica, França, Alemanha, Itália, Luxemburgo, Holanda, Dinamarca, Irlanda, Reino Unido, Grécia, Portugal, Espanha, Áustria, Finlândia e Suécia, Hungria, Estónia, Letónia, Lituânia, Polónia, Eslováquia, República Checa, Chipre e Malta.

## Índice de Matérias

FICHA TÉCNICA .....	II
Agradecimentos.....	III
Resumo .....	IV
Abstract .....	V
Simbologia e Notações .....	VI
Índice de Matérias .....	VIII
Índice de Figuras .....	X
Índice de Quadros .....	XII
1. Introdução.....	I
1.1. Inovação e progresso .....	4
1.2. O hidrogénio .....	6
1.3. Produção de hidrogénio .....	8
2. Cianobactérias .....	10
2.1. Cianobactéria filamentosa <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.....	12
2.2. Marcos históricos .....	13
2.3. Produção de biohidrogénio .....	14
2.4. Estratégia para maximizar a produção de H <sub>2</sub> .....	18
3. Futuros desafios à biofotólise directa pela <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.....	20
3.1. Limitações bioquímicas .....	20
3.1.1 Eficiência .....	20
3.1.2. Sensibilidade ao oxigénio.....	27
3.1.3. Consumo de hidrogénio .....	29
3.1.4. Balanço energético e de electrões .....	29
3.2. Limitações tecnológicas .....	30



3.2.1. Área e volume do reactor .....	30
3.2.2. Custo do reactor .....	33
3.2.3. Características do reactor .....	34
3.2.4. Separação dos gases.....	34
3.3. Limitações laboratoriais.....	35
4. Metodologia .....	37
4.1. Os organismos .....	37
4.2. Ensaio de crescimento .....	39
4.2.1. Análise do pH .....	40
4.2.2. Espectrofotometria .....	40
4.2.3. Análise do peso seco .....	40
4.2.4. Análise matemática .....	41
4.3. Ensaio de produção de hidrogénio.....	42
4.3.1. Preparação das culturas .....	42
4.3.2. Determinação do teor em hidrogénio.....	42
4.3.3. Medição da DO correspondente .....	43
5. Análise e discussão de resultados .....	44
5.1. Taxa específica de crescimento.....	44
5.2. Ensaio de produção de hidrogénio.....	52
5.2.1. Regime de luz contínua e descontínua.....	54
5.2.2. Regime de luz contínua com duas diferentes intensidades.....	56
6. Conclusões.....	58
7. Bibliografia.....	60

## Índice de Figuras

Figura 1. 1 - Gráfico da evolução dos diversos tipos de fontes energéticas (Adaptado de Schindler <i>et al.</i> , 2008). .....	3
Figura 1. 2 - Potenciais técnicas (excluindo a biomassa) para a produção de H <sub>2</sub> a partir de energias renováveis, na UE-25 (Adaptado de Schindler <i>et al.</i> , 2006). .....	4
Figura 2. 1 - Imagens de cianobactérias: (A) <i>Gloeocapsa</i> (unicelular), (B) <i>Merismopedia</i> (colonial); (C) <i>Lyngbya</i> (filamentosas sem diferenciação celular); D – <i>Anabaena</i> (filamentosa com diferenciação celular) ( <a href="http://www.keweenawalgae.mtu.edu/ALGAL_PAGES/cyanobacteria.htm">http://www.keweenawalgae.mtu.edu/ALGAL_PAGES/cyanobacteria.htm</a> ; <a href="http://tolweb.org/Cyanobacteria/2290">http://tolweb.org/Cyanobacteria/2290</a> ). .....	11
Figura 2. 2 - Esquema da fotossíntese e biofotólise. O nível energético dos electrões desde a oxidação da água eleva-se por acção de fotões que incidem nos fotossistemas I e II. O NADPH é usado na redução do CO <sub>2</sub> durante a fotossíntese, levando à produção e acumulação de hidratos de carbono (CH <sub>2</sub> O). O poder redutor da Ferredoxina pode também ser direccionado para produção de hidrogénio através da hidrogenase (Adaptado de Yu e Takahashi, 2007). .....	12
Figura 2. 3 - (A) <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 estirpe selvagem ( <i>wild type</i> ) em fundo brilhante; os heterocistos são visíveis como células maiores e morfologicamente diferentes. (B) Autofluorescência dos mesmos filamentos, onde os pontos pretos correspondem aos heterocistos. (C) Filamentos de células vegetativas com os heterocistos a azul (Moslavac, 2007). .....	13
Figura 2. 4 - Os heterocistos fornecem azoto sob a forma de glutamina às células vegetativas vizinhas, enquanto estas fornecem glúcidos (Adaptado de Golden e Yoon, 2003). .....	15
Figura 2. 5 - Produção de H <sub>2</sub> pela nitrogenase (Nase) localizada na célula heterocística, à direita. O oxigénio e hidrogénio são formados separadamente (separação espacial) e o CH <sub>2</sub> O é usado como fonte de poder redutor (Adaptado de Yu e Takahashi, 2007). .....	15
Figura 2. 6 - Enzimas directamente envolvidas no metabolismo do H <sub>2</sub> e modificações necessárias para aumentar a produção do mesmo (Adaptado de Tamagini <i>et al.</i> , 2002). .....	18
Figura 3. 1 - Valor do hidrogénio relativamente à eficiência de conversão da energia solar (Adaptado de Prince e Kheshgi, 2005). .....	21
Figura 3. 2 - Comparação de culturas com igual densidade de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , espécie selvagem (Stm3) e espécie mutante (3LR3) com pigmentos antena pequenos. a) Culturas com densidade de 6x10 <sup>6</sup> células.ml <sup>-1</sup> ; b) rendimento quântico fotossintético (φPSII) (Adaptado de Schenk <i>et al.</i> , 2008). .....	26
Figura 3. 3 - Penetração dos fotões e consequente produção de H <sub>2</sub> pela estirpe selvagem ( <i>wild type</i> ) e respectiva mutante da alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (Adaptado de Amos, 2004). .....	26
Figura 3. 4 - Produção de hidrogénio para duas diferentes concentrações da alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (Adaptado de Amos, 2004). .....	27
Figura 3. 5 - Consumo de energia final em Portugal por sector (Adaptado de <a href="http://www.iea.org/Textbase/stats/countryresults.asp?COUNTRY_CODE=PT&amp;Submit=Submit">http://www.iea.org/Textbase/stats/countryresults.asp?COUNTRY_CODE=PT&amp;Submit=Submit</a> ). .....	31

- Figura 4. 1 – Crescimento de culturas de *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes em atmosfera aeróbia, temperatura de 25° C, agitação orbital e iluminação contínua de 54  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  .....39
- Figura 4. 2 – Reactores para a produção de  $\text{H}_2$  pela *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes. Os reactores encontravam-se em posição inversa, numa estufa a 25° C, sujeitos a radiação de 54 ou 152  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  conforme o ensaio realizado. ....42
- Figura 5. 1 - Curvas de crescimento da *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes em meio BG11 (à esquerda) e meio BG11<sub>0</sub> (à direita), da densidade óptica ( $\ln(\text{DO}/\text{DO}_0)$ ) a 700 nm em função do tempo. As curvas de cada estirpe foram obtidas a partir de experiências em duplicado. Os resultados representam a média e o respectivo desvio-padrão. ....46
- Figura 5. 2 – Evolução do peso seco da *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes em meio BG11 (à esquerda) e meio BG11<sub>0</sub> (à direita) em função do tempo. As curvas de cada estirpe foram obtidas a partir de experiências em duplicado. Os resultados representam a média e o respectivo desvio-padrão. ....47
- Figura 5. 3 – Representação do  $\ln(\text{DO}/\text{DO}_0)$  com  $\lambda = 700$  nm para determinação das taxas específicas de crescimento da *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes, em condições aeróbias, do dia 1 ao dia 14, em meio BG11 (à esquerda) e BG11<sub>0</sub> (à direita).  $T = 25^\circ \text{C}$ ; agitação orbital de 110 rpm e  $\text{DO}_0$  correspondente à densidade óptica no tempo zero. ....49
- Figura 5. 4 – Representação do  $\ln(\text{DO}/\text{DO}_0)$  com  $\lambda = 700$  nm para determinação das taxas específicas de crescimento da *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes, em condições aeróbias, do dia 14 ao dia 30, em meio BG11 (à esquerda) e BG11<sub>0</sub> (à direita).  $T = 25^\circ \text{C}$ ; agitação orbital de 110 rpm e  $\text{DO}_0$  correspondente à densidade óptica no tempo zero. ....50
- Figura 5. 5 - Produção de hidrogénio em reactores fechados pela *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes, em meio BG11<sub>0</sub>, em atmosfera de árgon sob radiação contínua (à esquerda) e descontínua: 16h luz/8h escuro (à direita), com intensidade luminosa de 54  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . As curvas de cada estirpe foram obtidas a partir de experiências em duplicado. Os resultados representam a média e o respectivo desvio-padrão. ....55
- Figura 5. 6 - Produção de hidrogénio em reactores fechados pela *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes, em meio BG11<sub>0</sub> em atmosfera de árgon sob radiação contínua de intensidade luminosa de 54  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (à esquerda) e sob radiação contínua com intensidade de 152  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (à direita). As curvas de cada estirpe foram obtidas a partir de experiências em duplicado. Os resultados representam a média e o respectivo desvio-padrão. ....57

## Índice de Quadros

Quadro 1. 1 - Estratégias de desenvolvimento do biohidrogénio em diferentes países (Adaptado de <a href="http://www.unep.or.jp/ietc/Publications/INSIGHT/Fal-96/9.asp">http://www.unep.or.jp/ietc/Publications/INSIGHT/Fal-96/9.asp</a> ). ....	6
Quadro 1. 2 - Energia específica de diferentes combustíveis ( <a href="http://www.h2data.de">http://www.h2data.de</a> ). ....	7
Quadro 1. 3 - Percentagem de produção de H <sub>2</sub> (Balat, 2009). ....	8
Quadro 1. 4 - Características de processos termoquímicos de produção de H <sub>2</sub> (Adaptado de Santos e Santos, 2004; Balat, 2009). ....	9
Quadro 3. 1 - Eficiências das enzimas hidrogenase e nitrogenase segundo uma biofotólise directa e indirecta (Prince e Kheshgi, 2005). ....	22
Quadro 3. 2 - Dimensão do reactor necessário para alimentar células de combustível PM de diferentes necessidades ( <i>outputs</i> ). (Adaptado de Levin <i>et al.</i> , 2004). ....	32
Quadro 4. 1 – Composição dos macronutrientes do meio BG11. ....	37
Quadro 4. 2 - Composição dos micronutrientes do meio BG11 ....	38
Quadro 4. 3 - Resistência das culturas em estudo aos antibióticos (Masukawa, 2002b). ....	38
Quadro 5. 1 - Densidade óptica média inicial, a 700 nm, para cada cultura. ....	44
Quadro 5. 2 – Taxa específica de crescimento e tempo de duplicação da <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 e mutantes em meio BG11.....	51
Quadro 5. 3 - Taxa específica de crescimento e tempo de duplicação da <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 e mutantes em meio BG11 <sub>0</sub> . ....	51
Quadro 5. 4 - Densidade óptica média inicial para cada cultura. ....	52

"If we knew what it was we were doing, it would not be called research, would it?"

Albert Einstein

## 1. Introdução

As alterações climáticas são um dos assuntos que caracterizam o século XXI. Quaisquer decisões sobre este tema terão repercussões nas próximas décadas: é globalmente aceite que as alterações de certos factores, como as taxas de emissões de dióxido de carbono, podem ter repercussões nas previsões ao nível climático. O Homem tem o desafio de encontrar uma série de políticas, práticas e comportamentos que conjuguem investimentos económicos a longo prazo e uma melhoria da qualidade de vida, com um clima sustentável e ecossistemas viáveis. Os desafios que se levantam requerem o empenho dos governos, em políticas de redução das emissões de carbono e investimentos na pesquisa de energias alternativas (The National Academies, 2008).

A dependência energética actual recai sobre os combustíveis fósseis (em cerca de 80%), que não são ilimitados. A sua utilização leva a emissões de poluentes como  $\text{CO}_x$ ,  $\text{NO}_x$ ,  $\text{SO}_x$ ,  $\text{C}_x\text{H}_x$ , cinzas, entre outros (Debabrata e Veziroglu, 2001). Nos últimos 200 anos verificou-se um aumento acentuado na concentração do  $\text{CO}_2$  atmosférico e a temperatura média na superfície da Terra aumentou  $0,5^\circ\text{C}$  no século XX, sendo o mais quente dos últimos cinco. O relatório do *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC) conclui que existe uma forte evidência para que a maioria do aquecimento observado nos últimos 50 anos seja resultante das actividades humanas (Houghton *et al.*, 2001).

Em 1970 era já feita pesquisa ao nível das tecnologias de energias renováveis, com o intuito de substituir os combustíveis fósseis que se consideravam esgotáveis a curto prazo. Receava-se que a subida dos preços deste tipo de combustíveis pudesse restringir o crescimento da economia mundial. Duma maneira geral, e ao contrário dos combustíveis fósseis, as energias renováveis estão relacionadas com: poupança nas despesas de importação dos combustíveis, redução do custo de transporte de combustíveis, redução de emissões gasosas poluentes, segurança no abastecimento, baixos custos de operação, reciclagem de resíduos, redução das emissões de  $\text{CO}_2$ , sequestro de carbono, entre outros (Owens, 2002).

Além dos citados benefícios, a União Europeia, e Portugal em particular, assumiram certos compromissos ao nível ambiental, com efeito na competitividade e na inovação, nomeadamente (DPPRI, 2007):

- Redução de 8% dos gases com efeito de estufa, que para Portugal se traduz numa limitação do crescimento deste tipo de gases de 27% relativamente a 1990;
- Aumento em 45%, até 2010, da produção de electricidade a partir de fontes de energia renováveis;
- Poupança global do consumo de energia final em 1% ao ano (relativamente à média entre 2001 e 2005), até 2017;
- Implementação duma taxa de imposto automóvel de 60% em função das emissões de CO<sub>2</sub>, em Janeiro de 2008;
- Aumento de 1%, até 2010, da despesa pública em I&D em % do PIB.

Estudos apontam para que, a longo prazo, as energias renováveis superem o fornecimento de electricidade a partir dos combustíveis fósseis e mesmo do nuclear (Figura 1.1). Ao nível global, a energia fotovoltaica e eólica tornar-se-ão os pilares das energias renováveis (Schindler *et al.*, 2008).

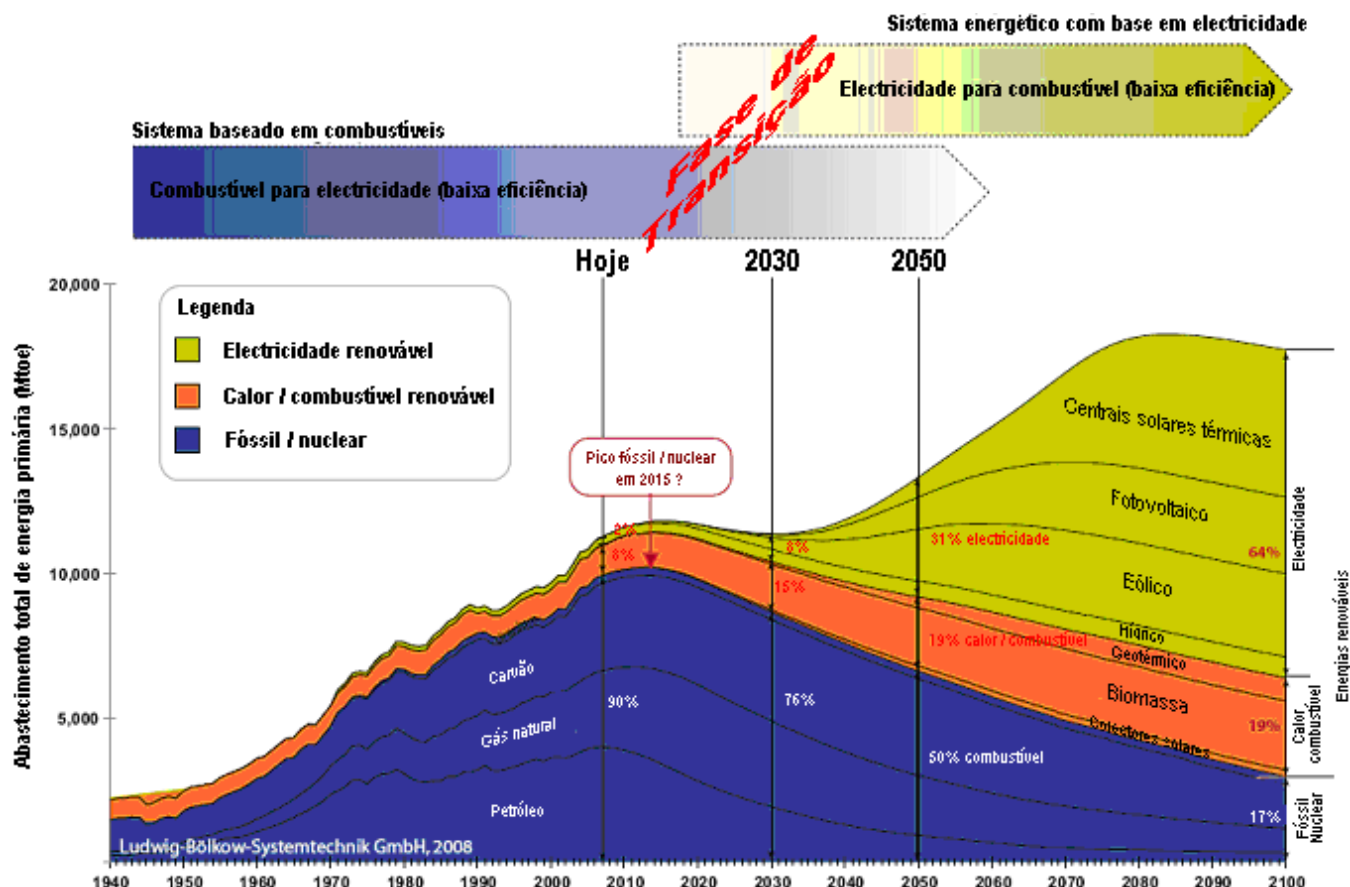


Figura 1. 1 - Gráfico da evolução dos diversos tipos de fontes energéticas (Adaptado de Schindler *et al.*, 2008).

As energias renováveis têm um elevado potencial para gerar hidrogénio de forma a suprimir as necessidades de combustível (Figura 1.2), ao nível europeu (UE-25). A biomassa é excluída por ser considerada como uma fonte incapaz de fazer face às necessidades assinaladas. O sector dos transportes consumiu em 2002, 14000 PJ/ano incluindo 12000 PJ/ano para o sector rodoviário. Tendo em conta estas necessidades, a energia armazenada como hidrogénio poderia ser amplamente utilizada no sector automóvel, através de células combustíveis (Schindler *et al.*, 2006).



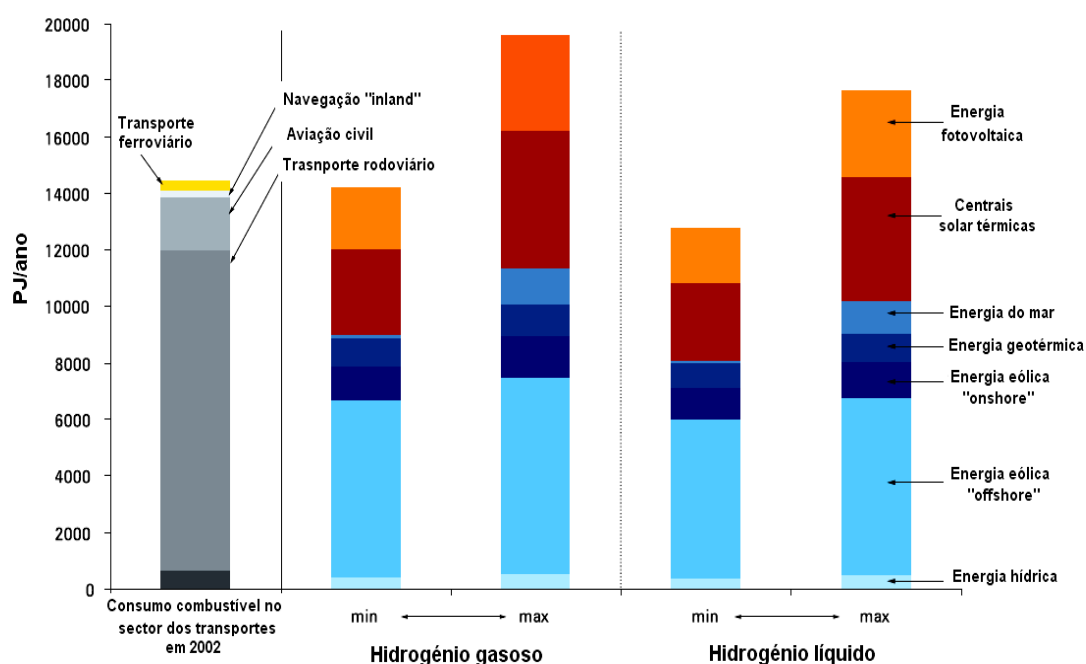


Figura 1. 2 - Potenciais técnicos (excluindo a biomassa) para a produção de H<sub>2</sub> a partir de energias renováveis, na UE-25 (Adaptado de Schindler *et al.*, 2006).

### 1.1. Inovação e progresso

O hidrogénio é um combustível renovável e promissor para o sector dos transportes, como verificado no capítulo anterior, além de poder ser usado em aplicações domésticas e industriais. Estão a ser feitas pesquisas no sentido de o utilizar em pilhas de combustível de veículos eléctricos, sendo expectável uma procura crescente a curto e longo prazo (Balat, 2009). O hidrogénio produzido por microrganismos fotossintéticos destaca-se porque a sua fonte é a energia solar, considerada uma das melhores maneiras de obter energia "limpa". Contudo, é necessário progredir cientificamente em quatro grandes áreas ([www.esf.org](http://www.esf.org)):

- Biotecnologia: biocombustível de organismos fotossintéticos modificados;
- Fotocatálise: desenvolvimento de "solar-to-fuel cells" também designadas de folhas artificiais;
- Ciências sociais: problemas que advêm da oposição à inovação e o envolvimento público;
- Questões político-económicas: regulações ao nível governamental, parcerias público-privadas, infra-estruturas educacionais.

**Projectos em Portugal** – Ao nível nacional existem alguns projectos na área do biohidrogénio, nomeadamente o projecto base deste trabalho (PTDC/ENR/68457/2006), a decorrer no Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG), financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT). Este instituto suporta também o estudo do biohidrogénio a partir de bactérias. O Instituto de Biologia Molecular e Celular do Porto, integrado no projecto europeu BioModularH2 (FP6), um consórcio entre Universidades europeias e uma israelita, estuda a produção de biohidrogénio através de cianobactérias. (<http://www.enseignement.polytechnique.fr/profs/biochimie/Alfonso.Jaramillo/BioModularH2/index.php/>)

**Projectos internacionais** - Existem projectos coordenados na União Europeia pela plataforma inter-governamental COST - *European Cooperation in Science and Technology* (<http://www.cost.esf.org>). No âmbito do 7º Quadro da União Europeia (UE), uma das áreas prioritárias é o estudo e aplicação de fontes de energias renováveis e “limpas”, entre as quais se destaca o hidrogénio ([http://cordis.europa.eu/fp7/energy/home\\_en.html](http://cordis.europa.eu/fp7/energy/home_en.html)). Ao nível internacional o Quadro 1.1 resume o investimento de vários países, em diferentes estratégias que visam desenvolver a produção biológica de H<sub>2</sub>. Os Estados Unidos lideram as pesquisas em diferentes áreas, seguidos do Japão e do Reino Unido. Portugal faz-se representar no que toca ao desenvolvimento das hidrogenases.

Quadro 1. 1 - Estratégias de desenvolvimento do biohidrogénio em diferentes países (Adaptado de <http://www.unep.or.jp/ietc/Publications/INSIGHT/Fal-96/9.asp>).

Estratégia a desenvolver	Países						
	EUA	Japão	Reino Unido	França	Holanda	Portugal	Itália
Hidrogenase	XX	X	XX	X	X	X	
Nitrogenase	XX	X	XX	X			
Engenharia Genética	XX						
Fotossistemas	XX		X				
Pesquisa de organismos	X	XX					
Fotólise de biomassa	XX						X
Tratamento de águas residuais	X	XX					X
Organismos termófilos	XX						
Outros processos	X	XX					X

XX- muito activo; X – activo.

## 1.2. O hidrogénio

O hidrogénio é o elemento químico mais abundante no Universo, apesar de não existir sob a forma livre. É o elemento mais leve e o que contém o maior valor energético, cerca de 120 MJ.kg<sup>-1</sup>. É constituído por um único electrão em torno do núcleo, capaz de ser ionizado sob certas condições, produzindo corrente eléctrica. Apresenta como características principais (<http://www.h2data.de>; <http://environmentalchemistry.com/yogi/periodic/H.html>):

Massa específica: **0,084 kg.m<sup>-3</sup>**

Coeficiente de difusão: **0,61 cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>**

Condutividade térmica: **1,897 mW.cm<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup>**

Densidade:	<b>0,0899 kg.N<sup>-1</sup>m<sup>-3</sup></b>
Limite de explosão no ar:	<b>4 a 75% em volume</b>
Temperatura de evaporação:	<b>20,390 K (0,1013 MPa)</b>

O elevado potencial do hidrogénio está relacionado com o seu elevado poder calorífico - **120 MJ.kg<sup>-1</sup> ou 33,3 kWh.kg<sup>-1</sup>** comparativamente com outros combustíveis (Quadro 1.2):

Quadro 1. 2 - Energia específica de diferentes combustíveis (<http://www.h2data.de>).

Combustível	Energia específica (kWh.kg <sup>-1</sup> )
Hidrogénio livre	33,3
Crude	11,6
Gasóleo	11,9
Gasolina	12,0
Gás natural (82% CH <sub>4</sub> )	10,6

A atmosfera contém 0,07% de H<sub>2</sub>, enquanto que a superfície terrestre contém cerca de 0,14%. No processo de combustão do hidrogénio gera-se como produto a água, sendo por isso considerado como um combustível limpo, não poluente. Além de vector energético, o hidrogénio pode ter outros usos, que equivalem já a 3% da energia consumida hoje em dia, sendo expectável um crescimento significativo nos próximos anos (Debabrata e Veziroglu, 2001):

- Reagente em processos de hidrogenação: utilizado para produzir compostos de baixo peso molecular, compostos saturados, remoção de enxofre, compostos azotados;
- Remoção de O<sub>2</sub>: usado para, quimicamente, remover pequenas quantidades de oxigénio, prevenindo oxidações e corrosões;
- Combustível em motores de rockets;
- Agente refrigerante em geradores eléctricos, devido às suas propriedades físicas únicas.

### 1.3. Produção de hidrogénio

Existem actualmente diversas formas de produzir hidrogénio, sendo que a maioria usa combustíveis fósseis como fonte (Quadro 1.3). A fonte dominante na produção de  $H_2$  é o gás natural seguido do petróleo (Balat, 2009).

Quadro 1. 3 - Percentagem de produção de  $H_2$  (Balat, 2009).

Fonte	$m^3.ano^{-1}$	%
Gás natural	$240 \times 10^9$	48
Petróleo	$150 \times 10^9$	30
Carvão	$90 \times 10^9$	18
Electrólise	$20 \times 10^9$	4
Total	$500 \times 10^9$	100

Os processos mais comuns de produzir hidrogénio são (Madamwar *et al.*, 2000):

- Produção a partir de combustíveis fósseis e biomassa: reformação do gás natural com vapor (*steam reforming*), oxidação parcial de hidrocarbonetos e reformação autotérmica, gasificação do carvão, pirólise e gasificação da biomassa;
- Produção a partir da água através de métodos não biológicos: processos térmicos e termoquímicos, fotólise e electrólise da água;
- Produção por via biológica: por fermentação ou por processos fotobiológicos. No primeiro caso, membros da família *Enterobacteriaceae* produzem  $H_2$  para libertar o poder redutor que se gera na degradação de carbono orgânico. No segundo caso, algas, bactérias fotossintéticas e cianobactérias sob acção da radiação solar, reduzem a água, compostos de enxofre ou compostos orgânicos, usando o seu poder redutor para gerar  $H_2$  através de enzimas específicas (hidrogenases e nitrogenases).

O Quadro 1.4 resume algumas vantagens e desvantagens de processos não biológicos.

**Quadro 1. 4 - Características de processos termoquímicos de produção de H<sub>2</sub> (Adaptado de Santos e Santos, 2004; Balat, 2009).**

Processos termoquímicos						
	Gás natural	Oxidação parcial e reformação autotérmica	Gasificação do carvão	Electrólise da água	Pirólise da Biomassa	Gasificação da Biomassa
<b>Rendimentos</b>	70-90%	65-75%	48%	95%	13-50%	50-85%
<b>Vantagens</b>	Elevada pureza	Não necessita de fonte de calor	Tecnologia já implementada; Produção a baixo custo	Forma “limpa” de produzir H <sub>2</sub> , se produzida a partir de energia renovável	Combustível neutro em termos de CO <sub>2</sub> ; Baixos teores de cinzas e enxofre; Fonte energética renovável	Combustível neutro em termos de CO <sub>2</sub> ; Baixos teores de cinzas e enxofre; Fonte energética renovável
<b>Desvantagens</b>	Processo caro por unidade de combustível; Uso de combustíveis fósseis; Libertação de CO <sub>2</sub>	Uso de combustíveis fósseis	Produz mais CO <sub>2</sub> que as outras tecnologias; Produção centralizada; Dificuldades na purificação do hidrogénio	Grande necessidade de energia (actualmente proveniente de combustíveis fósseis)	Baixa densidade energética do combustível; Elevado teor em humidade; Dificuldades de manuseamento e transporte	Baixa densidade energética do combustível; Elevado teor em humidade; Dificuldades de manuseamento e transporte; Elevada produção de CO

Como anteriormente referido, além destes processos, existem alternativas em investigação, nomeadamente o hidrogénio fotobiológico, alvo de estudo neste trabalho.

## 2. Cianobactérias

As cianobactérias estão entre os organismos ideais para a produção de hidrogénio, pelos seus requisitos nutricionais mínimos (sais minerais e água), utilizando a radiação solar como fonte de energia e tendo  $H_2$  e  $O_2$  como principais produtos. O impacte poluente no ambiente é mínimo, pois a biomassa residual pode ser usada como nutriente piscícola e/ou alimento para animais, extracção de compostos bioactivos, produção de metano por digestão anaeróbia, entre outros (Masukawa, 2002a; Spalaore, 2006).

Estes organismos, anteriormente designados por algas azuis-verdes, têm origem no Pré-Câmbrico (com registos fósseis de formas unicelulares há 3500 milhões de anos, no Pré-Câmbrico Inferior e de formas filamentosas por altura do Pré-Câmbrico Médio). Actualmente, as cianobactérias podem encontrar-se em *habitats* terrestres, aquáticos (água doce ou salgada) bem como em ambientes extremos (nascentes termais e lagos gelados) (Schopf, 2000). As cianobactérias heterocísticas como a *Anabaena* sp. são raras em zonas oceânicas oligotróficas, desenvolvendo-se preferencialmente em águas de baixa temperatura, doces ou salobras (evitando zonas tropicais, de águas quentes), onde existe uma maior concentração de nutrientes, tal como o ferro, úteis ao seu desenvolvimento (Stal, 2000; Berman-Frank *et al.*, 2007).

Apresentam uma variedade de cores, que inclui o verde, azul, vermelho, castanho, amarelo e até mesmo o preto, devido às diferentes combinações dos pigmentos fotossintéticos: clorofila *a*, carotenóides e ficobiliproteínas. Estes microrganismos são responsáveis pela coloração das nascentes termais de Yellowstone e, presumivelmente, o Mar Vermelho deve o seu nome aos *blooms* de espécies planctónicas de *Trichodesmium* (cianobactéria filamentosa) (Ward e Castenholz, 2000). Apesar de bastante uniformes, em termos nutricionais e metabólicos, constituem um grupo diversificado em termos morfológicos, apresentando formas unicelulares, filamentosas e coloniais (Figura 2.1). Certas cianobactérias filamentosas têm a capacidade de diferenciar células estruturalmente modificadas e funcionalmente especializadas: os acinetos (células de resistência) e os heterocistos (células especializadas na fixação de  $N_2$ ), distinguindo-as de outros organismos

procariontes que não possuem qualquer grau de diferenciação e desenvolvimento. Estes micorganismos são capazes de estabelecer relações de simbiose com protistas, animais, fungos e plantas (Stal, 2000).

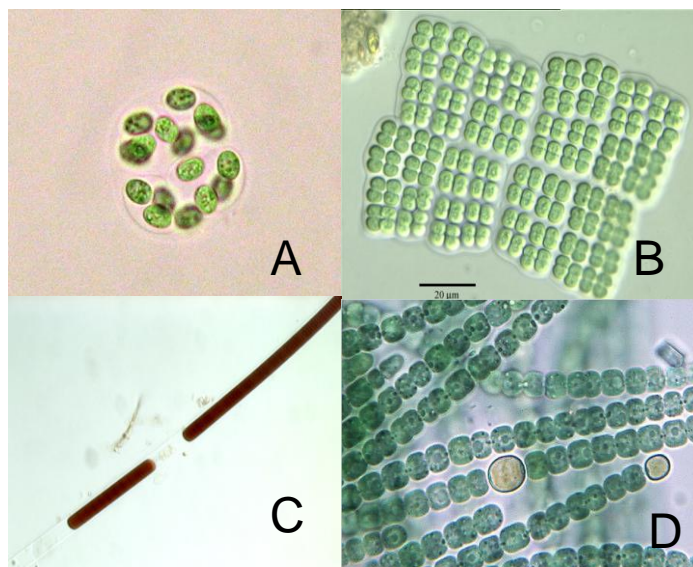


Figura 2. 1 - Imagens de cianobactérias: (A) *Gloeocapsa* (unicelular), (B) *Merismopedia* (colonial); (C) *Lyngbya* (filamentosas sem diferenciação celular); D – *Anabaena* (filamentosa com diferenciação celular) ([http://www.keweenawalgae.mtu.edu/ALGAL\\_PAGES/cyanobacteria.htm](http://www.keweenawalgae.mtu.edu/ALGAL_PAGES/cyanobacteria.htm); <http://tolweb.org/Cyanobacteria/2290>).

Uma característica distinta destes seres é a capacidade de realizarem fotossíntese, tal como as plantas superiores (Das e Veziroglu, 2001). Na membrana dos tilacóides ocorre uma série de reacções esquematizadas na Figura 2.2. Durante a fase fotoquímica, os pigmentos no fotossistema PSII (P680) absorvem os fotões com um comprimento de onda inferior a 680 nm, gerando um complexo de oxidação capaz de dissociar a molécula de água em protões ( $H^+$ ), electrões ( $e^-$ ) e  $O_2$ . Gera-se assim um fluxo de electrões através de diferentes aceitadores até ao fotossistema PSI (P700). Neste organelo, os pigmentos absorvem fotões com comprimento de onda inferior a 700 nm, capazes de aumentar o nível energético dos electrões, que reduzem a Ferredoxina, que por sua vez reduz a molécula de  $NADP^+$  a NADPH. Entretanto o gradiente electroquímico/protónico que se gera dentro do tilacóide leva à síntese de ATP, através da enzima ATP sintetase. Posteriormente, na fase bioquímica, o  $CO_2$  é reduzido através do Ciclo de Calvin, na presença das moléculas de ATP e NADPH previamente formadas. O Carbono assim reduzido dá origem a moléculas de glicose.



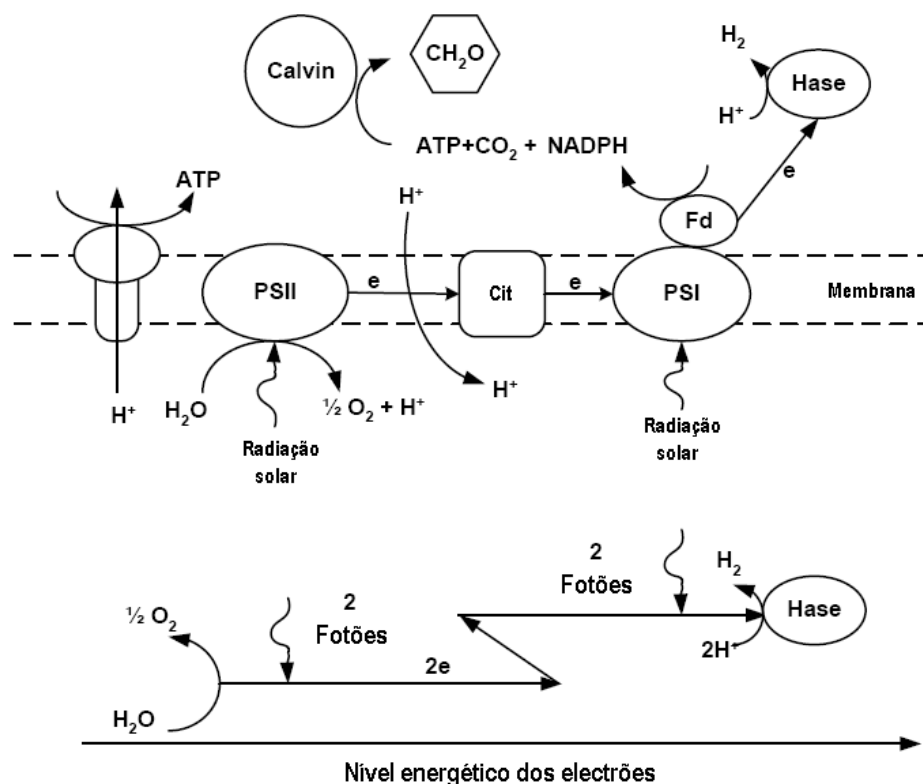
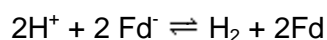


Figura 2. 2 - Esquema da fotossíntese e biofotólise. O nível energético dos electrões desde a oxidação da água eleva-se por acção de fotões que incidem nos fotossistemas I e II. O NADPH é usado na redução do  $\text{CO}_2$  durante a fotossíntese, levando à produção e acumulação de hidratos de carbono ( $\text{CH}_2\text{O}$ ). O poder redutor da Ferredoxina pode também ser direccionado para produção de hidrogénio através da hidrogenase (Adaptado de Yu e Takahashi, 2007).

Em certas condições, o poder redutor da ferredoxina pode ser usado pela hidrogenase ou nitrogenase para reduzir prótons, levando à formação de hidrogénio molecular, tal como demonstrado na equação (Yu e Takahashi, 2007):



## 2.1. Cianobactéria filamentosa *Anabaena* sp. PCC 7120

*Anabaena* sp. PCC 7120, também conhecida como *Nostoc* sp. 7120, é uma cianobactéria Gram-negativa (Figura 2.3). A sua característica morfológica mais proeminente é a multicelularidade, sendo capaz de formar filamentos com 100 ou mais células vegetativas idênticas. Tal como em todas as células Gram-negativas possui uma membrana interna e outra externa separadas pelo periplasma. Esta última é contínua ao longo do filamento, enquanto que a membrana interna é exclusiva de cada célula (Moslavac, 2007).

Tal como anteriormente referido, esta cianobactéria possui células especializadas, denominadas por heterocistos que se diferenciam completa e irreversivelmente 12-20h após a remoção de fontes de azoto do meio (Berman-Frank *et al.*, 2007). Contudo, trabalhos experimentais de Kang *et al.* (2005) demonstraram que a *Anabaena* sp. é capaz de diferenciar heterocistos em meio azotado ( $\text{NO}_3^-$ ) quando na atmosfera são injectadas algumas percentagens de  $\text{CO}_2$  (entre 1 e 5%). Estas células são caracterizadas por: espessa membrana que reduz a difusão do  $\text{O}_2$ , alta actividade no fotossistema I (PSI), ausência do fotossistema II (PSII) e perda de capacidade de divisão (Postgate, 1998; Stal, 2000). A presença prévia no meio de formas azotadas como  $\text{NH}_4^+$  ou ureia inibem a diferenciação dos heterocistos (Kang *et al.*, 2005), inibição também causada pela radiação ultra-violeta (Gao *et al.*, 2007).

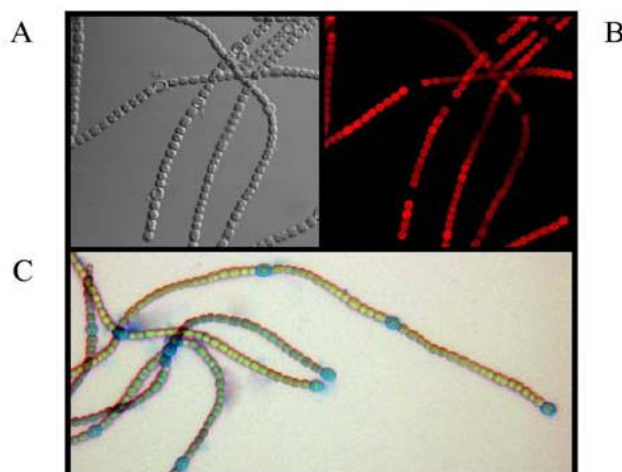


Figura 2. 3 - (A) *Anabaena* sp. PCC 7120 estirpe selvagem (*wild type*) em fundo brilhante; os heterocistos são visíveis como células maiores e morfologicamente diferentes. (B) Autofluorescência dos mesmos filamentos, onde os pontos pretos correspondem aos heterocistos. (C) Filamentos de células vegetativas com os heterocistos a azul (Moslavac, 2007).

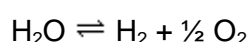
## 2.2. Marcos históricos

A produção de hidrogénio pela cianobactéria filamentosa *Anabaena* foi inicialmente observada por Jackson e Ellms em 1896 ([http://www.archive.org/stream/minnesotabotpt103macmrich/minnesotabotpt103macmrich\\_djvu.txt](http://www.archive.org/stream/minnesotabotpt103macmrich/minnesotabotpt103macmrich_djvu.txt)). Contudo o estudo da produção de  $\text{H}_2$  fotobiológico teve início com o trabalho de Gaffron e Rubin com a microalga verde *Scenedesmus obliquus*, em 1942 (Gaffron e Rubin, 1942). Foi demonstrado que, após

um período de adaptação a anaerobiose no escuro, os organismos produziam H<sub>2</sub> na ausência de luz, com baixas taxas e inversamente (altas taxas) quando iluminados.

### 2.3. Produção de biohidrogénio

As cianobactérias são potenciais produtores de biohidrogénio, um processo que tem como base uma biofotólise directa (reação de hidrólise com consequente produção de H<sub>2</sub>, sob acção de radiação solar) (Yu e Takahashi, 2007):

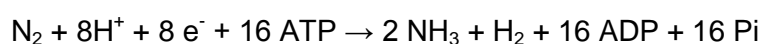


Nas cianobactérias filamentosas, a existência de heterocistos com as características acima referidas, permite uma separação espacial entre a produção de hidrogénio e de oxigénio (Stal, 2000; Hallenbeck e Benemann, 2002).

A biofotólise indirecta é um processo diverso, onde ocorre uma separação temporal de produção de H<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> com duas fases: de “luz”, onde ocorre a fotossíntese para produção de glúcidos que são acumulados, e sofrem uma fermentação numa fase “escura” ou sem radiação solar. Esta estratégia parece ser geralmente adoptada pelas cianobactérias não heterocísticas (Benemann, 1998; Berman-Frank *et al.*, 2007).

#### 2.3.1. Produção de H<sub>2</sub> a partir da nitrogenase

No caso da *Anabaena* sp. em estudo, a produção de hidrogénio pode dar-se nas células vegetativas ou nos heterocistos. Nestes encontra-se protegida do oxigénio a enzima nitrogenase, cuja principal função é a fixação de azoto atmosférico (fonte de azoto para as células), reduzindo-o a amoníaco com consumo de moléculas de ATP. Durante este processo ocorre igualmente a formação de H<sub>2</sub> (Stal, 2000):



A amónia ( $\text{NH}_4^+$ ) é posteriormente convertida em glutamina, através da glutamina sintetase, que passa então para as células vegetativas adjacentes (Das e Veziroglu, 2001). Por sua vez, os heterocistos não conseguem fixar o  $\text{CO}_2$ , por ausência da RuBisCO, dependendo das células vegetativas para obter fonte de carbono (Gao *et al.*, 2007). As Figuras 2.4 e 2.5 ilustram de forma simplificada o processo que ocorre entre estes dois tipos de células.

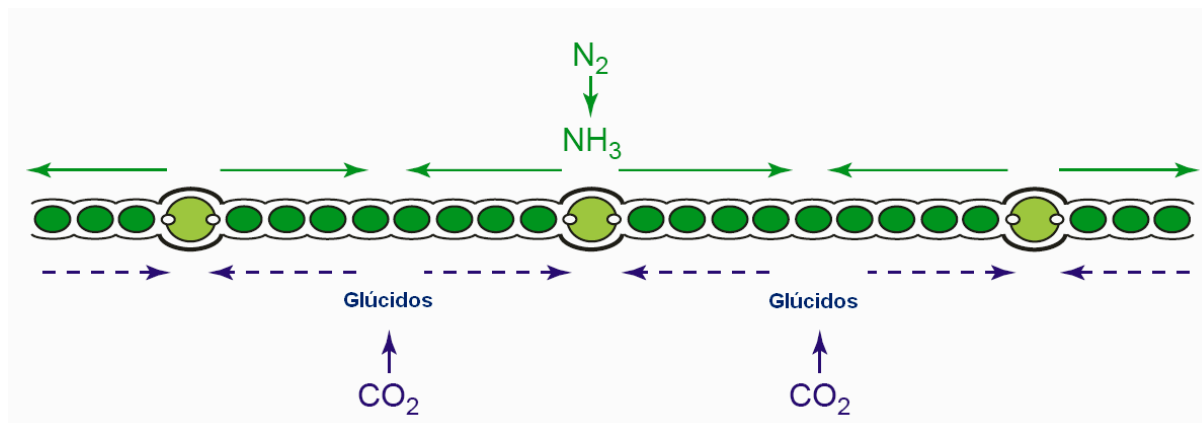


Figura 2. 4 - Os heterocistos fornecem azoto sob a forma de glutamina às células vegetativas vizinhas, enquanto estas fornecem glúcidos (Adaptado de Golden e Yoon, 2003).

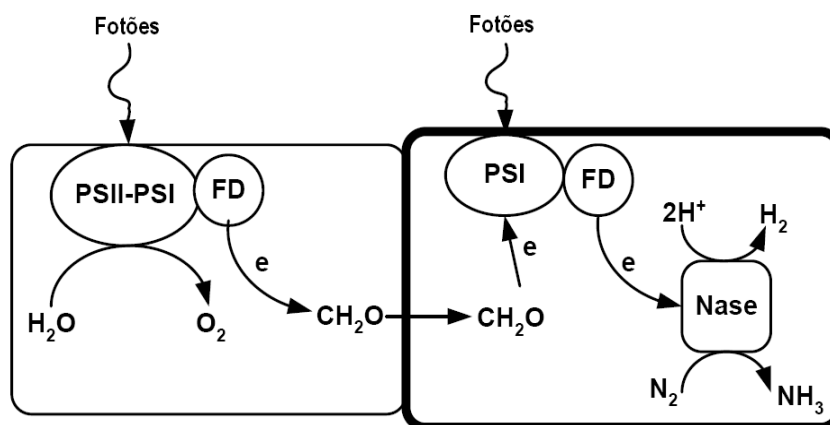


Figura 2. 5 - Produção de  $\text{H}_2$  pela nitrogenase (Nase) localizada na célula heterocística, à direita. O oxigénio e hidrogénio são formados separadamente (separação espacial) e o  $\text{CH}_2\text{O}$  é usado como fonte de poder redutor (Adaptado de Yu e Takahashi, 2007).

A nitrogenase da *Anabaena* sp. é um complexo enzimático, composta por centros activos metálicos. É constituída pela dinitrogenase (proteína de MoFe:  $\alpha_2\beta_2$ ) e pela dinitrogenase reductase (proteína de Fe:  $\gamma_2$ ), duas proteínas de cor escura, activas apenas quando estão ambas presentes. A primeira e maior componente é constituída por 4 sub-unidades e é responsável pela redução catalítica das moléculas de substrato. Contém aproximadamente 2 moles de molibdénio e 24-32 moles de ferro e enxofre por mole de proteína. A

dinitrogenase reductase aceita electrões de dadores como a ferredoxina ou flavodoxina e transfere-os para a dinitrogenase com consequente consumo de duas moléculas de ATP por electrão transferido. Esta segunda proteína é constituída por duas sub-unidades de igual peso, com cerca de quatro átomos de ferro e enxofre por molécula (Postgate, 1998; Madamwar *et al.*, 2000).

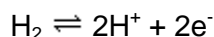
Deste modo, a redução de  $N_2$  a  $2NH_3$ , para a qual são necessários 6 electrões, leva à hidrólise de 12 moléculas de ATP. Por sua vez, cada molécula de  $H_2$  necessita de dois electrões, consumindo-se aqui 4 moléculas de ATP. Assim este processo é energeticamente muito desfavorável, consumindo-se 16 moléculas de ATP, na produção de uma única molécula de hidrogénio. Além de ATP, outro ingrediente essencial para a nitrogenase é o ião magnésio ( $Mg^{2+}$ ), uma vez que na sua ausência a nitrogenase não funciona. Este ião permite à enzima a reacção com a molécula de ATP, que necessita de converter-se num sal de mono-magnésio (ATPMg), para poder reagir com a enzima (Postgate, 1998).

Numa atmosfera que contenha azoto, a sua fixação é predominante, tornando a produção do hidrogénio um sub-produto, ou inibindo até a sua formação (Madamwar *et al.*, 2000; Yu e Takahashi, 2007). Contudo, se estiver presente outro gás na atmosfera, como por exemplo o árgon, a nitrogenase continua activa (sem dispendir tanto ATP) e a produzir  $H_2$ , que se torna assim, o produto principal (Postgate, 1998; Yu e Takahashi, 2007).

A propriedade diazotrófica da nitrogenase confere à *Anabaena* um efeito de biofertilizante e fotoprodutor de compostos orgânicos azotados, facto que resultou na sua introdução com sucesso, em campos de arroz (Kerby *et al.*, 1987). É de acrescentar que esta enzima é negativamente afectada pela radiação ultra-violeta (Lesser, 2008).

### 2.3.2. Produção de $H_2$ a partir das hidrogenases

O termo hidrogenase refere-se a uma classe de enzimas capazes de catalizar a reacção de oxidação do hidrogénio a protões e a redução dos protões a hidrogénio molecular. Ocorre a produção de  $H_2$  sem consumo de ATP:



Esta propriedade faz das hidrogenases entidades simples, capazes de diminuir o excesso de poder redutor existente, ou ganhar energia através da oxidação do hidrogénio. A hidrogenase bi-direccional consegue realizar esta reacção em ambos os sentidos, enquanto que a hidrogenase de assimilação apenas o faz no sentido da oxidação do  $H_2$  (Madamwar *et al.*, 2000). Estas enzimas são muito sensíveis e podem ser inibidas pelo oxigénio (Prince e Kheshgi, 2005). De acordo com a composição metálica do seu centro activo, estas enzimas são classificadas como hidrogenases NiFe (Tamagnini *et al.*, 2002).

#### *Hidrogenase de assimilação*

Esta enzima tem sido encontrada em todas as cianobactérias fixadoras de  $N_2$ , estudadas até ao momento. Localiza-se na face citoplasmática da membrana celular, dentro dos heterocistos, contactando com o  $H_2$  formado pela nitrogenase (Carrasco *et al.*, 1995; Lindblad *et al.*, 2002). Esta hidrogenase tem um *cluster* de FeS (co-factor inorgânico ligado ao centro activo da enzima e que está envolvido, neste caso, nas reacções redox), de elevado potencial, capaz de transferir os electrões do  $H_2$  para a enzima. Ao quebrar a molécula de hidrogénio, a enzima contribui para o aumento do poder redutor disponível (Prince e Kheshgi, 2005). Os genes desta hidrogenase foram sequenciados por Carrasco *et al.* (1995), genes esses que codificam uma sub-unidade maior (*hupL*) e uma sub-unidade menor (*hupS*).

#### *Hidrogenase bi-direccional*

Esta enzima, encontra-se em diversas cianoactérias desde filamentosas a unicelulares, heterocísticas ou não, fixadoras de azoto ou não (Serebriakova *et al.*, 1994; Berman-Frank *et al.*, 2007) localiza-se na membrana citoplasmática e tem a capacidade de produzir e consumir  $H_2$ . Esta dualidade sugere que a enzima funcione como uma válvula. Por um lado, compensa o baixo potencial electrónico que se gera durante a fotossíntese, impedindo que a velocidade na cadeia de transporte de electrões diminua; por outro, é capaz de produzir hidrogénio como forma de armazenar electrões gerados durante períodos de elevada intensidade luminosa (Appel *et al.*, 2000; Madamwar *et al.*, 2000). Esta afinidade para consumir  $H_2$  pode estar relacionada com o seu baixo  $K_m$  para o hidrogénio (constante de afinidade) (Masukawa *et al.*, 2002b). Por outro, ao produzir hidrogénio, a enzima diminui o excesso de poder redutor gerado em situações anaeróbias. Contudo, não existe ainda consenso quanto à função desta enzima (Lindblad *et al.*, 2002). A hidrogenase bi-direccional

tem um centro activo de NiFe (Prince e Kheshgi, 2005), sendo constituída por duas sub-unidades: uma hidrogenase (codificada pelos genes *hoxY* e *hoxH*) e outra diaforase (cujos genes são *hoxF* e *hoxU*) (Schmitz *et al.*, 1995; Schmitz e Bothe, 1996; Madamwar *et al.*, 2000).

Apesar do benefício de não consumir ATP, a hidrogenase bi-direccional possui uma actividade inferior relativamente à nitrogenase, resultando numa menor produção de  $H_2$ . Além disso, parece ser inibida por pressões parciais de hidrogénio relativamente baixas (<10%) (Benemann, 2000).

## 2.4. Estratégia para maximizar a produção de $H_2$

O uso de mutantes apresenta-se como uma ferramenta útil no estudo de diferentes componentes dum processo complexo (Rai e Tiwari, 1999). Na cianobactéria em estudo, a produção total de hidrogénio é o resultado da libertação de  $H_2$  pela(s) nitrogenase(s) e hidrogenase(s) bi-direccional e o seu consumo, principalmente pela hidrogenase de assimilação. Consequentemente, é necessária a produção/selecção de mutantes deficientes na actividade de assimilação de  $H_2$  (Figura 2.6) (Tamagnini *et al.*, 2002).

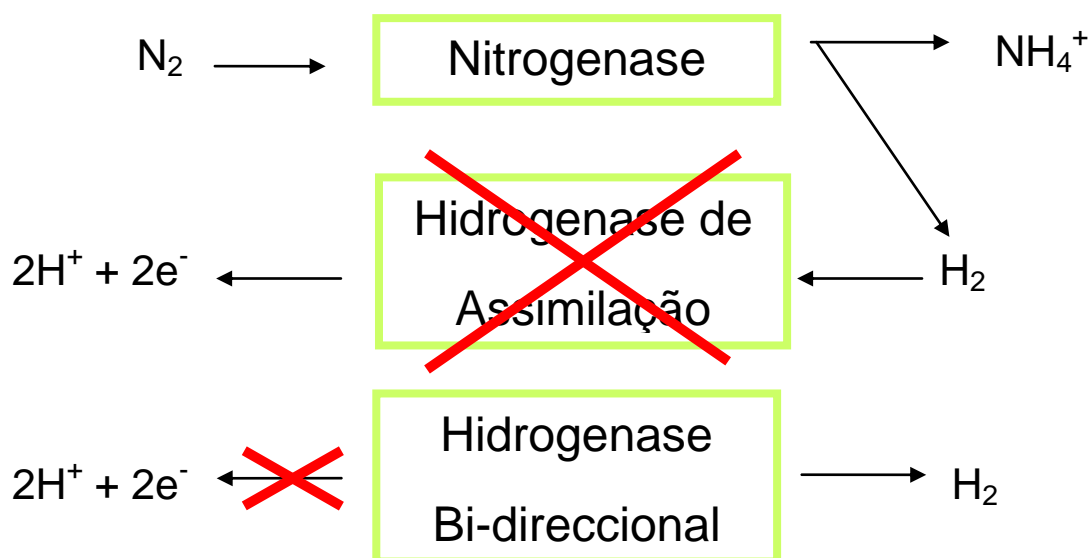


Figura 2. 6 - Enzimas directamente envolvidas no metabolismo do  $H_2$  e modificações necessárias para aumentar a produção do mesmo (Adaptado de Tamagnini *et al.*, 2002).

Esta dissertação faz parte do projecto PTDC/ENR/68457/2006, já referido anteriormente. Foram estudadas e comparadas quatro culturas da cianobactéria *Anabaena* sp. PCC 7120: selvagem (*wild type*), *hupL*<sup>-</sup> (deficiente na hidrogenase de assimilação), *hoxH*<sup>-</sup> (deficiente na hidrogenase bi-direccional) e *hupL*<sup>-</sup>/*hoxH*<sup>-</sup> (deficiente em ambas as hidrogenases). O principal objectivo foi a maximização da produção de hidrogénio. Neste sentido, e tendo em conta estudos anteriores, foram testados diversos parâmetros de modo a estudar o efeito dos mesmos nas enzimas directamente envolvidas no processo. Foram também estudadas as condições de crescimento desta cianobactéria.

O objectivo principal centrou-se na produção industrial de hidrogénio, que poderá ser feita com o contributo viável desta cianobactéria ou de uma das suas mutantes. Em paralelo, há uma contribuição para o desenvolvimento do biohidrogénio, ou seja, um avanço no sentido de uma energia renovável e não poluente.



### **3. Futuros desafios à biofotólise directa pela *Anabaena* sp. PCC 7120**

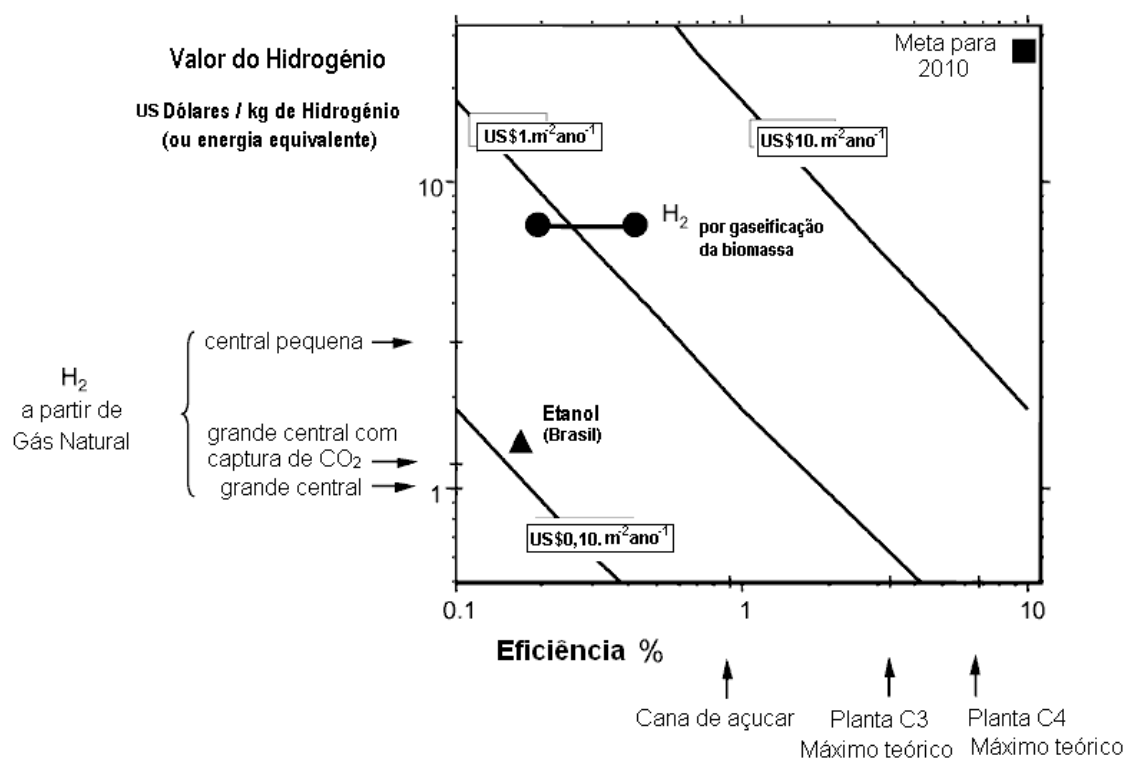
A biofotólise directa compete com outros mecanismos de produção biológica de hidrogénio, ao nível da taxa de produção e do custo, mas os avanços tecnológicos poderão viabilizar esta tecnologia. Os desafios mais importantes prendem-se com a eficiência de conversão, sensibilidade ao oxigénio e o custo e tamanho do reaktor (Ahmann e Dorgan, 2007). Estes parâmetros devem ser explorados de modo a viabilizar a produção biológica de hidrogénio pelas cianobactérias em geral, e pela *Anabaena* sp. PCC 7120 em particular.

#### ***3.1. Limitações bioquímicas***

##### **3.1.1 Eficiência**

A eficiência energética é definida como a razão entre a energia produzida sob a forma de H<sub>2</sub> e os recursos consumidos pelos micorganismos (Ahmann e Dorgan, 2007). De modo a atingir um sucesso comercial, a produção fotobiológica de hidrogénio necessita de uma elevada eficiência de conversão da radiação solar (Polle *et al.*, 2002).

Um estudo realizado em 2004 por Prince e Kheshgi refere que o DOE (*American Department of Energy*) estipulava nesse momento, como meta, até 2010, o custo do biohidrogénio de US\$30.kg<sup>-1</sup>, com uma eficiência de produção de 10% (Figura 3.1). A enunciada meta colocava o método fotobiológico de produção de hidrogénio cerca de três vezes mais caro do que a gasificação da biomassa e cerca de trinta vezes mais caro do que uma grande central de reformação de gás natural. Em contrapartida a eficiência estipulada era a mais ambiciosa.



■ - Meta estipulada pela DOE para o biohidrogénio.

● - preço do hidrogénio por gasificação da biomassa.

▲ - preço e eficiência do etanol (não incluindo sub-produtos ou inputs energéticos).

No eixo horizontal encontram-se as eficiências teóricas máximas da cana de açúcar e das plantas C3 e C4. No eixo vertical encontra-se o preço de produção de H<sub>2</sub> por reformação de gás natural numa grande central (1,2x10<sup>6</sup> kg de H<sub>2</sub>/dia) e numa pequena central (480 kg de H<sub>2</sub>/dia), assumindo como preço do gás natural 4,5 US Dólares/milhão BTU. As linhas diagonais representam o custo de produção por área, por ano (assumindo 210 W/m<sup>2</sup> de radiação de baixo comprimento de onda).

Figura 3. 1 - Valor do hidrogénio relativamente à eficiência de conversão da energia solar (Adaptado de Prince e Kheshgi, 2005).

Em 2005 o DOE estipulou como meta o valor de US\$2-3.kg<sup>-1</sup> de hidrogénio, independentemente do método de produção e de transporte ([http://www1.eere.energy.gov/hydrogenandfuelcells/news\\_cost\\_goal.html](http://www1.eere.energy.gov/hydrogenandfuelcells/news_cost_goal.html)).

Em localizações favoráveis e tendo em conta uma radiação média anual de 5 kWh/m<sup>2</sup>/dia, que equivale a 6,6 GJ/ano, para uma conversão de 10%, obtém-se 0,66 GJ passíveis de produzir 5,45 kg de hidrogénio por ano. Se o preço do hidrogénio rondar os US\$2.kg<sup>-1</sup> é possível obter o valor de **US\$10.m<sup>-2</sup>.ano<sup>-1</sup>**. Este valor implica a imposição de severas

restrições aos processos técnicos inerentes e da necessidade energética própria para conceber esta produção. Naturalmente, se a eficiência for inferior, será necessário aumentar as áreas de superfície do bioreactor (conceitos desenvolvidos no sub-capítulo 3.2) e consequentemente o preço do  $H_2$ . Contudo, este valor de eficiência (10%) é considerado como sobrevalorizado, pois os poucos estudos que fazem referência à eficiência de produção de fotobiohidrogénio apontam para valores que rondam 1%, ou seja,  $US\$1 H_2.m^{-2}.ano^{-1}$  (Hallenbeck e Benemann, 2002; Schenk *et al.*, 2008).

Teoricamente, a fotoprodução de biohidrogénio poderia atingir outras percentagens, com um máximo de 40,7%. Tendo em conta a intensidade dos fótons capazes de impulsionar a reacção fotossintética (680 nm) e as várias enzimas envolvidas, apresentam-se no Quadro 3.1, as eficiências teoricamente possíveis (Prince e Khesghi, 2005).

**Quadro 3. 1 - Eficiências das enzimas hidrogenase e nitrogenase segundo uma biofotólise directa e indirecta (Prince e Khesghi, 2005).**

Reacção	Eficiência Energética
A produção simultânea de oxigénio e hidrogénio pelos dois fotossistemas representa-se pela seguinte equação:	
$2H_2O \rightleftharpoons 2H_2 + O_2 \quad \Delta H = 572,5 \text{ kJ}$	
<b>Biofotólise Directa</b>	Esta reacção requer 4 electrões que, por sua vez, requerem 8 fótons. O fóton com maior comprimento de onda a dar origem a esta reacção (680nm) tem uma energia de 176 kJ.
Hidrogenase	Assim sendo, a máxima eficiência de produção de $H_2$ será <b>40,7%</b> , ou seja, $572,5 / (176 \times 8)$ .

Quadro 3. 2 (continuação).

Reacção	Eficiência energética
<b>Biofotólise Directa</b>	<p>Além das anteriores necessidades energéticas, a nitrogenase requer também 2 ATP por cada electrão. O esquema fotossintético, apresentado na Figura 2.2, gera aproximadamente 1 ATP por electrão que percorre todo o sistema, extrapolando-se a necessidade de que o referido</p> <p>Nitrogenase processo ocorra duas vezes, para formar 2 moléculas de ATP. A produção de H<sub>2</sub> necessita de 4 ATP, contabilizando-se assim um total de 16 fotões.</p> <p>Nesta situação a eficiência baixa para metade, ou seja, para <b>20,3%</b> (527,5 / (176x16)).</p> <p>A primeira fase deste processo envolve a formação de O<sub>2</sub> e a fixação de CO<sub>2</sub> para formar glucose. A segunda fase envolve o consumo de glucose, libertando-se CO<sub>2</sub> com posterior formação de H<sub>2</sub>.</p>
<b>Biofotólise Indirecta</b>	$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CH}_2\text{O} + \text{O}_2 \quad \Delta H = 211,5 \text{ kJ}$
Hidrogenase	$\text{CH}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CO}_2 + 2\text{H}_2 \quad \Delta H = 361 \text{ kJ}$ $\Delta H_{\text{GLOBAL}} = 572,5 \text{ kJ}$ <p>A fixação de CO<sub>2</sub> requer 4 electrões e consequentemente 8 fotões, contudo a hidrólise dos glúcidos requer o mínimo de 1 fotão por electrão, prefazendo a necessidade de 12 fotões. A eficiência máxima deste processo é de <b>27,1%</b>.</p>
<b>Biofotólise Indirecta</b>	<p>Nesta situação, aliado às necessidades do caso anterior, o consumo de ATP pela nitrogenase exige a adição de 8 fotões, obtendo-se um total de 20.</p> <p>A eficiência global, com fotões de 680 nm, será de <b>16,3%</b>.</p>
Nitrogenase	

Infelizmente neste processo, a selecção natural parece não ter privilegiado a maximização do uso da energia ou eficiência fotónica. As reacções fotoquímicas que ocorrem nos fotossistemas envolvem apenas duas ou três clorofilas, mas as membranas contêm cerca de 300. Estas clorofilas adicionais, assim como outros pigmentos (tais como os carotenóides) são conhecidos como pigmentos antena, que aumentam substancialmente a probabilidade do fotão ser capturado e transferido para o fotossistema. O tamanho deste complexo antena leva a uma maximização da captura de fotões quando a intensidade luminosa é diminuta (Prince e Kheshgi, 2005). A taxa de transferência dos electrões entre os dois fotossistemas é cerca de 10 vezes inferior à taxa de captura de luz pelos pigmentos fotossintéticos (Hallenbeck e Benemann, 2002). Deste modo, quando a intensidade luminosa é elevada, o fotossistema absorve mais fotões do que aqueles que consegue utilizar, diminuindo assim a sua produtividade. Neste processo, o excesso de fotões acaba por ser libertado sob a forma de fluorescência ou calor. São desperdiçados cerca de 80% dos fotões absorvidos, o que obviamente se traduz em eficiências de conversão e produtividades celulares muito baixas (Polle *et al.*, 2002). Este fenómeno, designado por **“efeito de saturação da luz”** (Hallenbeck e Benemann, 2002; Ahmann e Dorgan, 2007), ocorre principalmente ao nível do fotossistema II (Schenk *et al.*, 2008). Um estudo de Masukawa *et al.* (2002a) revela que a *Anabaena* sp. PCC 7120 diminui a sua eficiência de conversão a partir dos 50 W.m<sup>-2</sup>.

Prince e Kheshgi (2005) afirmam que se não houver uma evolução das percentagens reais de eficiência de conversão, a produção fotossintética de H<sub>2</sub> não será mais do que uma mera curiosidade de laboratório.

## Soluções

Para aumentar a eficiência de conversão fotónica foram já propostas algumas soluções:

- Efeito de *flash* (*Flashing light effect*): efeito inicialmente descrito por Kok (1953). Através duma agitação rápida, as algas sofrem *flashes* de milisegundos de alta intensidade luminosa, seguidos de um relativamente longo período de obscuridade, que permite a lenta transferência electrónica entre os dois fotossistemas. Contudo, este efeito não é praticável devido às elevadas velocidades de mistura necessárias;
- Atenuação luminosa: é realizada através de fotobioreactores construídos na vertical ou na horizontal, mas orientados segundo o eixo norte-sul, de maneira a prevenir a

radiação directa com a possível ocorrência de foto-oxidação (Hallenbeck e Benemann, 2002; Schenk *et al.*, 2008);

- Desenvolvimento de mutantes com menos pigmentos antena (LHP – *Light Harvesting Pigments*): na Natureza as massas de água são intermitentemente iluminadas, sendo mais frequentes as baixas intensidades, o que levou a uma evolução no sentido de favorecer um elevado número de pigmentos por centro activo fotossintético (Hallenbeck e Benemann, 2002). Existem já estudos de manipulações genéticas onde foi diminuído o tamanho do complexo antena, ou seja, foram criadas mutantes com um teor em clorofilas inferior relativamente à espécie selvagem, principalmente ao nível do fotossistema II (Amos, 2004). Esta alteração levou a que culturas igualmente densas, sujeitas à mesma intensidade luminosa, tivessem uma maior produtividade pois o desperdício de fotões é menor. Esta mutação é particularmente favorável quando se pretendem elevadas densidades de biomassa (Nakajima e Ueda, 2000; Shenck *et al.*, 2008). A diminuição no teor de clorofilas leva a que as culturas fiquem com um tom de verde bastante mais claro (Figura 3.2). A Universidade de Califórnia-Berkeley desenvolveu uma estirpe mutante da alga *Chlamydomonas reinhardtii*, que contém menos pigmentos antena, permitindo uma penetração da luz 10 vezes maior (Figura 3.3). Neste caso, a luz atinge profundidades de 8 cm enquanto que na estirpe selvagem atinge os 4 cm. Ambas as culturas têm uma densidade de 0,2 g.L<sup>-1</sup> (Amos, 2004).

Esta mutação permite que mais luz penetre no bioreactor, evitando foto-inibição, pois os micorganismos mais à superfície acabam por absorver apenas a luz que necessitam, permitindo a penetração de mais fotões para o interior do reactor. Paralelamente ocorre menos desperdício energético e reduz-se o risco de danificação do PSII por foto-oxidação (Nakajima e Ueda, 2000; Polle *et al.*, 2002; Amos, 2004; Mussgnug *et al.*, 2007).

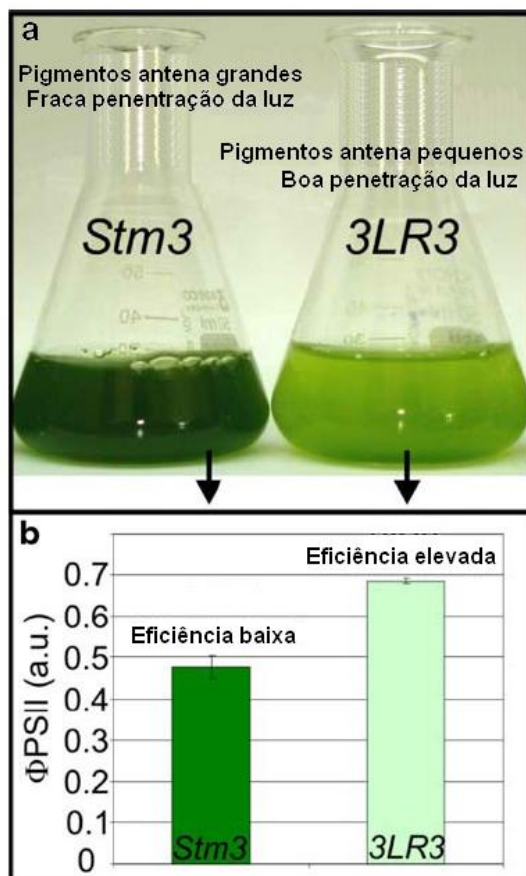


Figura 3. 2 - Comparação de culturas com igual densidade de *Chlamydomonas reinhardtii*, espécie selvagem (Stm3) e espécie mutante (3LR3) com pigmentos antena pequenos. a) Culturas com densidade de  $6 \times 10^6$  células. $\text{ml}^{-1}$ ; b) rendimento quântico fotossintético ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) (Adaptado de Schenk *et al.*, 2008).

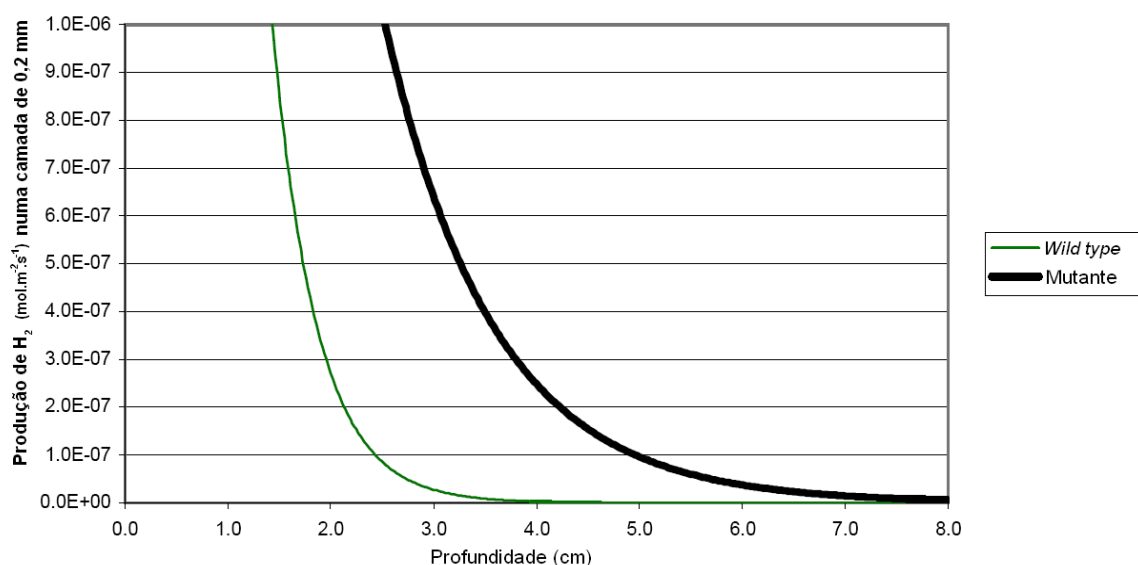


Figura 3. 3 - Penetração dos fotões e consequente produção de  $\text{H}_2$  pela estirpe selvagem (*wild type*) e respectiva mutante da alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Adaptado de Amos, 2004).

- Uso de concentrações de cultura mais diluídas de modo a permitir a penetração da luz e consequente produção de hidrogénio pelas células. Culturas mais concentradas permitem uma maior produção nas camadas superiores, decaindo rapidamente em profundidade. Soluções mais diluídas permitem que os fotões alcancem zonas mais profundas e sejam capturados pelos pigmentos antena. Tal efeito é demonstrado no gráfico da Figura 3.4, proveniente dum estudo com *Chlamydomonas reinhardtii* (Amos, 2004).

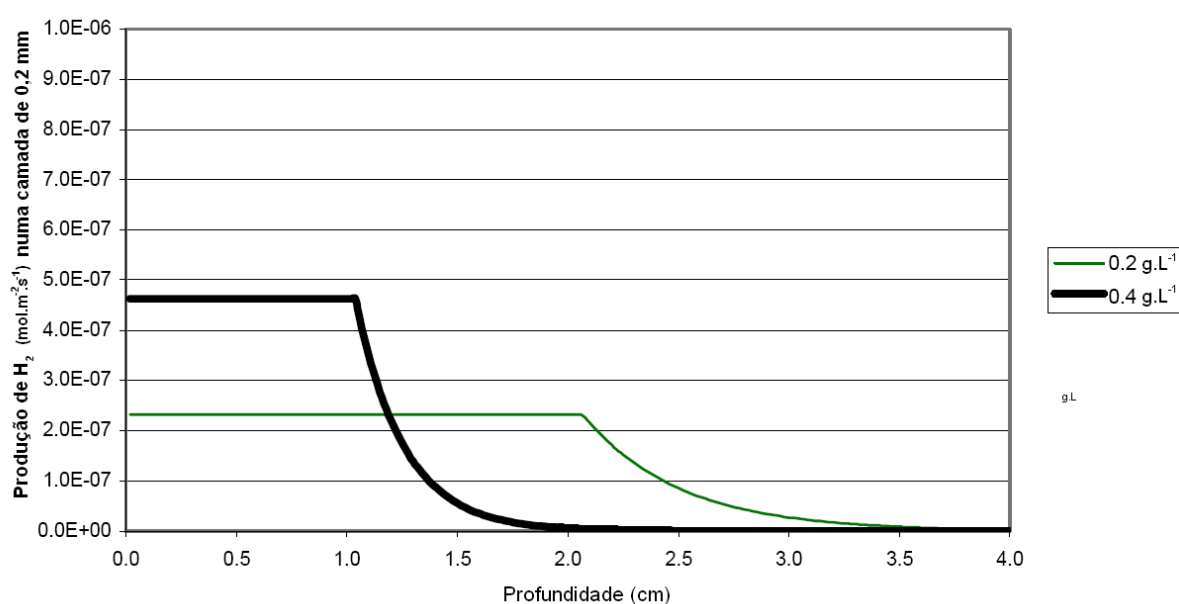


Figura 3. 4 - Produção de hidrogénio para duas diferentes concentrações da alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Adaptado de Amos, 2004).

### 3.1.2. Sensibilidade ao oxigénio

As enzimas envolvidas na produção de hidrogénio são extremamente sensíveis ao oxigénio (Tamagnini *et al.*, 2002; Prince e Kheshgi, 2005). Neste sentido, têm sido realizados estudos que tentam contornar esta questão para a biofotólise directa. Por outro lado, surgem opiniões de que a biofotólise directa contém intrínsecas limitações que não a tornam promissora (Benemann, 2000).



## Soluções

Tendo em conta a controvérsia relativamente à sensibilidade ao oxigénio, são sugeridas diversas alternativas:

- Estão a ser realizados estudos de modo a tentar encontrar/criar uma hidrogenase mais tolerante ao oxigénio. Estes estudos ainda não geraram conclusões aplicáveis (Swartz *et al.*, 2008).
- Outra possibilidade passa pela introdução de hidrogenases em heterocistos, uma solução actualmente em desenvolvimento (Heidorn e Lindblad, 2006; Spormann *et al.*, 2006).
- Uma alternativa à biofotólise directa será a biofotólise indirecta, onde existe uma separação temporal da produção dos gases  $O_2$  e  $H_2$ . Apesar de apresentar eficiências inferiores, como acima demonstrado, permite contornar o problema da sensibilidade ao oxigénio por parte das hidrogenases. Para que o processo seja rentável, são necessárias elevadas quantidades de glúcidos (Hallenbeck e Benemann, 2002).
- A produção de  $H_2$  pode ser também realizada por fotofermentação, um processo onde bactérias fotossintéticas são capazes de fermentar resíduos de ácidos orgânicos, tendo como fonte energética apenas a energia solar. Através da enzima nitrogenase conseguem produzir  $H_2$ , mas esta produção tem algumas contrariedades: uso da nitrogenase com inerente consumo energético, baixas taxas de conversão solar e grandes áreas de fotobioreactores anaeróbios (Hallenbeck e Benemann, 2002).
- As baixas produtividades de hidrogénio por biofotólise directa e indirecta por cianobactérias, leva a que a fermentação realizada por bactérias anaeróbias, na ausência de luz, pareça ser um processo mais promissor. No entanto, apesar de ser um processo alvo de intenso estudo, são ainda escassas as informações disponíveis. Este processo, com capacidade teórica de produzir 12 moles de  $H_2$  por cada mole de glucose fermentada, é semelhante à biofotólise indirecta, embora elimine a necessidade de fotobioreactores que encarecem o processo (Hallenbeck e Benemann, 2002). Contudo, enquanto que a biofotólise directa e indirecta são capazes de produzir  $H_2$  puro, a fermentação no escuro produz um gás com mistura de  $H_2$  e  $CO_2$ , podendo também conter vestígios de  $CH_4$ ,  $CO$  e  $H_2S$ . Este processo é altamente dependente do controlo de certos parâmetros como o pH, tempo de retenção e pressão parcial (Levin *et al.*, 2004), tendo ainda o passo adicional de separação dos gases.

### 3.1.3. Consumo de hidrogénio

O balanço da produção de hidrogénio é o resultado da quantidade produzida pela nitrogenase e pela hidrogenase bi-direccional, subtraindo-se o consumo deste gás pela hidrogenase de assimilação.

#### Soluções

Para fazer face ao consumo de hidrogénio pela hidrogenase de assimilação, a solução tem de passar pela engenharia genética:

- A produção de mutantes deficientes na enzima de assimilação parece ser a solução mais interessante (Tamagnini *et al.*, 2002; Levin *et al.*, 2004).

### 3.1.4. Balanço energético e de electrões

O fluxo de electrões nos tilacóides gera poder redutor e um potencial transmembranar usado na formação de ATP, ambos necessários no processo de fixação de CO<sub>2</sub>. A célula é capaz de permanecer em equilíbrio, controlando o ciclo de electrões em torno do fotossistema I. Como já anteriormente referido, quando o poder redutor é usado pela hidrogenase não há consumo de ATP, facto capaz de inibir o fluxo de electrões pelo acumular de ATP. Inversamente, a nitrogenase necessita de mais moléculas de ATP por electrão do que aquelas normalmente produzidas.

#### Soluções

O balanço energético e de electrões pode ser controlado de algumas formas:

- O potencial electrónico pode ser dissipado de maneira controlada, integrando proteínas nas membranas dos tilacóides, isto é, inserindo um canal polipeptídico de protões, que se expressa ao mesmo tempo que a hidrogenase, sendo capaz de dissipar o gradiente protónico através da membrana e evitando a acumulação de ATP (Lee, 2003).

- De forma a aumentar o potencial de ATP formado, seria necessário aumentar a criação desta molécula através do ciclo electrónico em torno do fotossistema I (Joliot e Joliot, 2002; Munekage *et al.*, 2004).

### **3.2. Limitações tecnológicas**

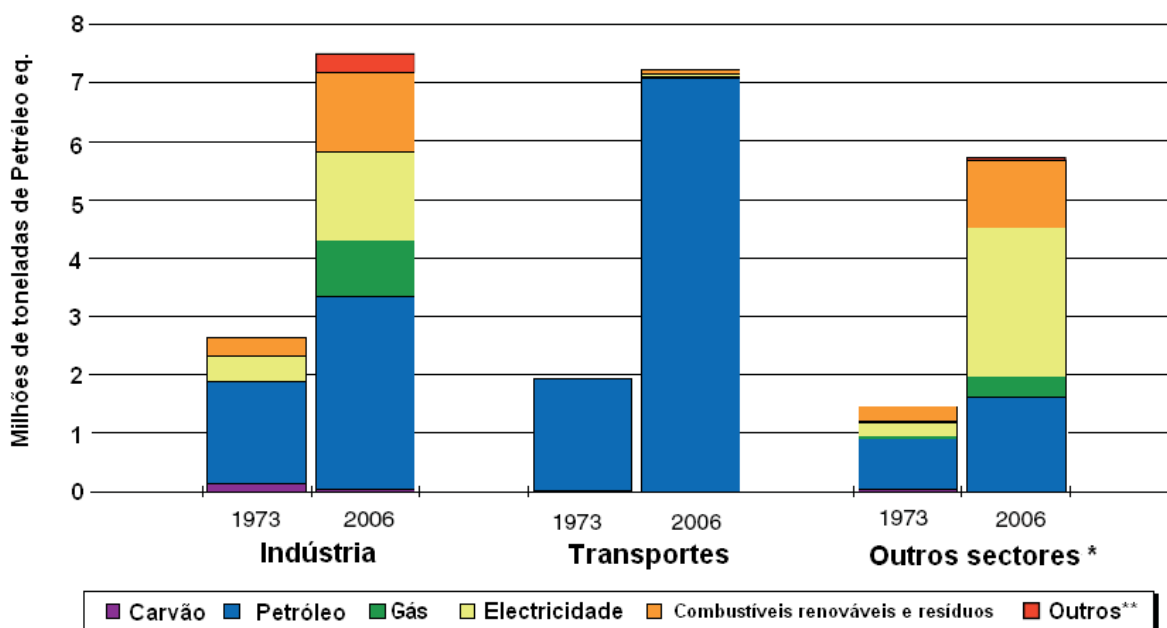
Para a economia do hidrogénio prosperar é necessário um avanço tecnológico, nomeadamente ao nível dos fotobioreactores (IME, 2009). O hidrogénio seria tanto mais economicamente interessante, caso pudesse ser produzido onde e quando é necessário. Contudo, o método fotobiológico de produção de  $H_2$  não parece ser passível de tal (Prince e Kheshgi, 2005).

#### **3.2.1. Área e volume do reactor**

Tendo em conta os cálculos anteriormente apresentados, em localizações favoráveis com 5 kWh.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup>, o que equivale a 6,6 GJ.ano<sup>-1</sup>, e um factor de conversão de 10%, obtém-se 0,66 GJ.m<sup>-2</sup>.ano<sup>-1</sup> passíveis de produzir 5,45 kg de hidrogénio por ano (por m<sup>2</sup>).

O hidrogénio pode ser a solução ideal para a indústria automóvel, principalmente por ser um vector energético capaz de gerar electricidade quando esta não é facilmente acessível (Schindler *et al.*, 2006). Visto em perspectiva, Portugal tem vindo a aumentar os seus consumos ao nível de diversos combustíveis e em todos os sectores (indústria, transportes e outros). No sector dos transportes em particular, houve um consumo em 2006 de mais de 7 milhões de toneladas de petróleo equivalente ([http://www.iea.org/Textbase/stats/countryresults.asp?COUNTRY\\_CODE=PT&Submit=Submit](http://www.iea.org/Textbase/stats/countryresults.asp?COUNTRY_CODE=PT&Submit=Submit)), sendo que 1 tonelada de petróleo equivalente (tep) corresponde a 11630 kWh (Figura 3.5), o que corresponde a cerca de 290 PJ (10<sup>15</sup> J).

Assim sendo, com uma eficiência de 10%, seria necessária uma área de fotobioreactor de 44 mil hectares.



\*Inclui os sectores residenciais, comerciais e serviços, agricultura/floresta, pesca e outros.

\*\* Inclui o uso directo de energia geotérmica/solar térmica e centrais de co-geração.

Figura 3. 5 - Consumo de energia final em Portugal por sector (Adaptado de [http://www.iea.org/Textbase/stats/countryresults.asp?COUNTRY\\_CODE=PT&Submit=Submit](http://www.iea.org/Textbase/stats/countryresults.asp?COUNTRY_CODE=PT&Submit=Submit)).

Levin *et al.* (2004) levou a cabo um estudo, onde calculou o volume de bioreactores, através de valores médios, mas indicativos da escala onde os diversos reactores se encontram de acordo com o processo produtivo. Esta escala baseia-se na capacidade de alimentação duma pilha de combustível do tipo PEMFC – membrana de permuta protónica (*proton exchange membrane fuel cell*), com diferentes capacidades: 1,5 kW, 2 kW, 2,5 kW e 5 kW (tendo em conta pilhas que conseguissem suprimir necessidades médias de consumo que variassem entre os  $13 \times 10^3$  e os  $20 \times 10^3$  kWh durante o ano). Para a biofotólise directa os reactores variavam de capacidade entre  $3,41 \times 10^5$  L para uma célula de 1 kW e  $1,71 \times 10^6$  L para uma célula de 5 kW. Estes valores levaram à conclusão de que esta produção não é de momento interessante. Mais promissores e realistas parecem ser os valores atingidos na fermentação no escuro por bactérias mesofílicas. Seriam possíveis reactores de 500 L para alimentar uma célula de 2,5 kW ou um de 1000 L para uma célula de 5 kW (Quadro 3.2).

**Quadro 3. 3 - Dimensão do reactor necessário para alimentar células de combustível PM de diferentes necessidades (outputs). (Adaptado de Levin *et al.*, 2004).**

Sistema produtivo de biohidrogénio	Taxa de produção (mmol H <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Dimensões do bioreactor <sup>a</sup> , em Litros, para alimentar uma célula com as seguintes capacidade:			
		1,0 kW	1,5 kW	2,5 kW	5,0 kW
Biofotólise directa	0,07	3,41x10 <sup>5</sup>	5,12x10 <sup>5</sup>	8,56x10 <sup>5</sup>	1,71x10 <sup>6</sup>
Biofotólise indirecta	0,355	6,73x10 <sup>4</sup>	1,01x10 <sup>5</sup>	1,69x10 <sup>5</sup>	3,37x10 <sup>5</sup>
Foto-fermentação	0,16	1,49x10 <sup>5</sup>	2,24x10 <sup>5</sup>	3,74x10 <sup>5</sup>	7,58x10 <sup>5</sup>
Oxidação de CO por <i>R. gelatinosus</i>	96,0	2,49x10 <sup>2</sup>	3,74x10 <sup>2</sup>	6,24x10 <sup>2</sup>	1,25x10 <sup>3</sup>
<b>Fermentações no escuro (bactérias)</b>					
Mesofílicas, estirpe "pura" <sup>b</sup>	21,0	1,14x10 <sup>3</sup>	1,71x10 <sup>3</sup>	2,85x10 <sup>3</sup>	5,7x10 <sup>3</sup>
Mesofílicas, indefinidas <sup>c</sup>	64,5	3,71x10 <sup>2</sup>	5,57x10 <sup>2</sup>	9,29x10 <sup>2</sup>	1,86x10 <sup>3</sup>
Mesofílicas indefinidas	121,0	1,98x10 <sup>2</sup>	2,97x10 <sup>2</sup>	4,95x10 <sup>2</sup>	9,89x10 <sup>2</sup>
Termofílicas indefinidas	8,2	2,91x10 <sup>3</sup>	4,38x10 <sup>3</sup>	7,31x10 <sup>3</sup>	1,46x10 <sup>4</sup>
Termofílicas extremas, indefinidas <sup>d</sup>	8,4	2,85x10 <sup>3</sup>	4,28x10 <sup>3</sup>	7,13x10 <sup>3</sup>	1,43x10 <sup>4</sup>

<sup>a</sup>Unidades aproximadas. Volumes calculados e arredondados<sup>b</sup>Espécie *Clostridium* #2<sup>c</sup>Consórcio de micorganismos desconhecidos, cultivados a partir de substrato natural seleccionados pelas condições de cultivo do reactor<sup>d</sup>*Caldicellulosiruptor saccharolyticus*

## Soluções

A área e volume do bioreactor são alvo de alguns estudos sendo de seguida apresentadas algumas soluções:

- Têm sido feitos esforços no sentido de otimizar reactores que façam face ao problema da área que ocupam, tais como os reactores de eixo vertical e os reactores de fibra óptica. Neste último caso existem espelhos concentradores que captam a energia luminosa, que é posteriormente encaminhada através de condutas de fibra óptica, até pequenos fotobioreactores (Hallenbeck e Benemann, 2002).

### 3.2.2. Custo do reactor

O tamanho do reactor está correlacionado com o seu preço e são ambos condicionados pela eficiência energética. As previsões de 10% de conversão são consideradas por muitos autores como sendo um valor optimista. Contudo, quanto mais baixo for este valor, maior será o reactor (Prince e Kheshgi, 2005).

Existem ainda poucos estudos de fotobioreactores adaptados para uma biofotólise directa. Benemann (1998), num estudo onde apresenta alguns custos para a produção de biohidrogénio, estipula um valor de US\$100.m<sup>-2</sup> para um reactor tubular de vidro (o custo do vidro representa 20% e os restantes 80% estão distribuídos por bombas, arrefecimento e limpeza, entre outros). O autor admite que seriam possíveis reactores com um custo mínimo de US\$50.m<sup>-2</sup>, em casos de desenho (*design*) semelhante a uma lagoa que seria coberta com um material, possivelmente plástico, impermeável ao H<sub>2</sub> e resistente. Neste estudo, Benemann comprova que os fotobioreactores são o factor que mais encarece todo o processo.

Partindo do pressuposto de que os bioreactores serão caros, é provável que a componente do crescimento dos microrganismos bioprodutores seja desenvolvida em lagoas abertas, sendo depois transferidos para bioreactores fechados para recolha do H<sub>2</sub> produzido (Prince e Kheshgi, 2005). Neste caso, valores como US\$10.m<sup>-2</sup> são apontados no estudo já citado de Benemann (1998), tendo em conta o fornecimento de água, CO<sub>2</sub> e a colheita.

### 3.2.3. Características do reactor

Podem-se distinguir duas tendências para o cultivo de microalgas: a) reactores abertos, com custos de construção baixos, mas em que o risco de contaminação por outros microrganismos ou por produtos químicos (orgânicos e inorgânicos) é elevado; b) reactores fechados, com desenho (*design*) específico e custos mais elevados, mas permitindo por sua vez condições mais controladas (Pohl *et al.*, 1987). Existem uma série de parâmetros relevantes para o bom funcionamento do fotobioreactor, nomeadamente sujidade, contaminação e controlo de pH, entre outros (Prince e Kheshgi, 2005).

#### Soluções

As características do bioreactor podem ser optimizadas da seguinte forma:

- Manter a superfície do reactor limpa, de modo a permitir uma boa penetração dos raios solares; criar uma superfície de difícil adesão;
- Controlar o crescimento de microrganismos que possam consumir o hidrogénio (tal como as bactérias metanogénicas);
- Controlo do pH por remoção do CO<sub>2</sub>.

### 3.2.4. Separação dos gases

É normalmente assumido que o hidrogénio produzido por microalgas e cianobactérias é relativamente puro, à parte de pequenas quantidades de vapor de água e CO<sub>2</sub>. Não contém contaminantes, de maior preocupação, como o monóxido de carbono ou o enxofre (Amos, 2004). Contudo, uma maior purificação pode ser obtida através de diversas medidas, abaixo indicadas.

#### Soluções

O problema da separação dos gases pode ser contornado através de:

- Sistemas membranares como o PVTMS (poliviniltrimetilsilano) (Levin *et al.*, 2004);

- Uso de separadores de partículas (*scrubbers*) a húmido contendo KOH para remoção do CO<sub>2</sub>, soluções de pirogalol alcalino para remover o O<sub>2</sub> e pode ainda fazer-se passar a mistura gasosa num secador para retirar o vapor de água, que faz baixar o poder calorífico do combustível (Das e Veziroglu, 2001).

### 3.3. Limitações laboratoriais

Existem ainda condicionantes laboratoriais que necessitam de ser aperfeiçoadas e que afectam a produção de H<sub>2</sub>:

- Salinidade – geralmente as cianobactérias preferem águas pouco salinas (excepto as espécies marinhas), possivelmente devido à energia que é necessária para eliminar ou impedir os iões Na<sup>+</sup> de entrarem nas células (Madamwar *et al.*, 2000);
- Composição do meio – micronutrientes como cobalto, cobre, molibdénio, zinco e níquel podem estimular a produção de H<sub>2</sub> (Madamwar *et al.*, 2000; Tamagnini *et al.*, 2002). Há ainda a explorar o efeito de outros substratos da nitrogenase, ou seja, moléculas que possuem uma tripla ligação capaz de ser quebrada pela enzima, assumindo a disponibilidade de ATP e Mg<sup>2+</sup>. São elas: o acetileno (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), cianeto de hidrogénio (HCN), ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) e o monóxido de carbono (CO). Este último, ao contrário dos outros substratos, não é reduzido pela nitrogenase. Liga-se ao centro activo da enzima, permitindo que esta reduza o hidrogénio mas não é consumido por ela. O acetileno é particularmente importante porque o seu produto, o etileno, consegue ser rápida e eficazmente detectado através de cromatografia gasosa. Esta reacção é a base do teste do acetileno, um processo comum para detectar a actividade da nitrogenase (Postgate, 1998).
- Existem ainda outros parâmetros para otimizar tais como a composição da fase gasosa, a idade e densidade da cultura, o pH e a temperatura do meio de cultura (Tamagnini *et al.*, 2002).

Subsistem ainda muitos desafios no campo da produção de hidrogénio por via biológica. Há autores que criticam o investimento que tem sido realizado principalmente ao nível da biofotólise directa. Segundo Benemann (2000) deviam ser concentrados esforços em factores limitantes como: eficiência de conversão, desenvolvimento da fermentação no escuro e engenharia de fotobioreactores de baixo custo. Este autor chega mesmo a afirmar que a fotoprodução de H<sub>2</sub> por cianobactérias fixadoras de azoto, não tem potencial a nível



futuro, principalmente devido à necessária ausência de oxigénio e posterior separação dos gases. Opinião contrária é apresentada por outros autores como Levin *et al.* (2004), que afirmam que este processo está ainda no início, apresentando uma promissora capacidade de evolução. Um conjunto de especialistas na conversão da energia solar em combustíveis (ESF, 2008) recomendam uma série de acções que visam o melhor aproveitamento solar, nomeadamente através de micorganismos fotossintéticos. Traçam como meta a conversão fotossintética acima descrita de 10% para os próximos 5-10 anos; a descoberta de novos organismos em 2-5 anos; recomendam que os reactores laboratoriais sejam usados para desenvolvimento de reactores piloto exteriores, de modo a que a componente tecnológica evolua em paralelo com o desenvolvimento molecular e bioquímico, aumentando a eficiência global do processo e levando ao desenvolvimento de bioreactores sustentáveis ambiental e economicamente entre 10-15 anos. Estes autores apostam também no aumento de parcerias público-privadas.

Por outro lado, o hiato existente entre cientistas que estudam o biohidrogénio e os engenheiros encarregues de desenvolver as células de combustível, dificulta a viabilização das aplicações práticas do biohidrogénio (Levin *et al.*, 2004).

## 4. Metodologia

### 4.1. Os organismos

A *Anabaena* sp. PCC 7120 e suas mutantes foram oferecidas pelo Professor H. Sakurai, através de um acordo MTA com a Universidade Waseda – Japão. As mutantes estudadas são as seguintes:

- *hupL*<sup>-</sup> - *Anabaena* sp. PCC 7120 deficiente no gene de acção da hidrogenase de assimilação;
- *hoxH*<sup>-</sup> - *Anabaena* sp. PCC 7120 deficiente no gene de acção da hidrogenase bi-direccional;
- *hupL*<sup>-</sup>/*hoxH*<sup>-</sup> - *Anabaena* sp. PCC 7120 deficiente nos genes de acção da hidrogenase de assimilação e na hidrogenase bi-direccional;

De modo a manter as culturas no banco de algas, estas foram repicadas semanalmente e deixadas a crescer em frascos de cultura (erlenmeyers), com meio de cultura BG11 (ver Quadro 4.1), sem agitação e sob o efeito da luz solar. O meio consistia em 1 litro de água desionizada que continha os macronutrientes necessários e 1 mL de micronutrientes. O meio BG11<sub>0</sub> tem composição igual, mas onde não é colocado NaNO<sub>3</sub> (fonte de azoto).

**Quadro 4. 1 – Composição dos macronutrientes do meio BG11.**

Macronutrientes em g.L <sup>-1</sup>	
NaNO <sub>3</sub>	1,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,04
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,036
Ácido cítrico	0,006
Citrato de amónia e ferro	0,006
EDTA	0,001
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,02

Quadro 4. 2 - Composição dos micronutrientes do meio BG11

Micronutrientes em g.L <sup>-1</sup>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,222
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,390
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,079
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0494

Eram por vezes repicadas em meio de cultura com antibiótico de espectro largo capazes de afectar a síntese de proteínas (<http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/654antibiotic.html>). Pretendia-se assegurar a irreversibilidade das mutações genéticas para certificar que as estirpes em estudo eram as correctas. O estudo elaborado por Masukawa *et al.* (2002b) revela que, aquando da mutação, foi inserida um gene que confere resistência a um antibiótico específico, de acordo com o Quadro 4.2.

Quadro 4. 3 - Resistência das culturas em estudo aos antibióticos (Masukawa, 2002b).

Culturas	Antibiótico	
	Neomicina (30 µg.mL <sup>-1</sup> )	Estreptomicina (2 µg.mL <sup>-1</sup> )
<i>hupL</i> <sup>-</sup>		X
<i>hoxH</i>	X	
<i>hupL</i> <sup>-</sup> / <i>hoxH</i>	X	X

As culturas foram observadas ao microscópio óptico OLYMPUS BH-2, para verificar a presença de alguma eventual contaminação.

## 4.2. Ensaio de crescimento

Ao longo de 42 dias, foram realizadas análises duplicadas ao crescimento, através de 8 frascos de cultura (erlenmeyers) de 500 mL (com cerca de 250 mL de cultura), com meio de cultura BG11<sub>0</sub>, previamente autoclavado, a 121° C durante 20 minutos e inoculados, em condições de assepsia e em duplicado para todas as estirpes: *wild type*, *hupL*<sup>-</sup>, *hoxH*<sup>-</sup> e *hupL*<sup>-</sup>/*hoxH*<sup>-</sup>.

As culturas encontravam-se em atmosfera aeróbia, temperatura de 25° C, agitação orbital de 110 rpm e iluminação contínua de 54  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Os frascos de cultura foram tapados com rolhas de algodão (Figura 4.1).



Figura 4. 1 – Crescimento de culturas de *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes em atmosfera aeróbia, temperatura de 25° C, agitação orbital e iluminação contínua de 54  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Foram feitas determinações analíticas de dois em dois dias, do pH, peso seco, densidade óptica (DO) a 700 nm e do teor em clorofila *a*, tal como é seguidamente descrito.

#### 4.2.1. Análise do pH

A determinação do pH foi realizada com um eléctrodo Inolab level 1, WTW.

#### 4.2.2. Espectofotometria

A análise da DO foi feita num espectrofotómetro Hitachi U-2000 a um comprimento de onda de 700 nm, tal como já realizado por Lindblad *et al.* (2002).

A determinação do teor em clorofila *a* foi feita a um comprimento de onda de 663 nm. A determinação da clorofila foi realizada de acordo com o seguinte protocolo experimental: retirou-se 1 mL da suspensão celular para um eppendorf e centrifugou-se a 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415 C) durante 3 minutos. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de metanol a 90% (v/v), à temperatura ambiente e colocaram-se os eppendorfs no escuro. Fez-se nova centrifugação e mediu-se a absorvância do sobrenadante para determinar o teor em clorofila *a*. A absorvância foi determinada a 663 nm (UV mini 1240, Shimadzu). A quantidade de Chl *a* foi determinada recorrendo ao uso da equação (Meeks e Castenholz, 1971):

$$C (\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}) = \text{DO}_{663\text{nm}} \times 12,7.$$

#### 4.2.3. Análise do peso seco

Foram preparadas caixas de *Petri* com filtros Whatman GF/C de 0,2  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro, identificadas e levadas a uma estufa Memmert a 80° C, durante 4 horas, após as quais foram transferidos para um excicador, por mais quatro horas. De seguida pesou-se cada uma das caixas de petri com os filtros. Após agitação num vortex VF2 – JANKE & KUNKZL, retirou-se um volume de amostra com uma pipeta esterilizada seguindo-se uma filtração por vácuo com o filtro correspondente à amostra. Posteriormente, as amostras filtradas foram colocadas na estufa, com o mesmo procedimento acima descrito.

O peso seco foi calculado com base na seguinte equação:

$$\text{Peso seco} = \text{Peso biomassa seca (g)} / \text{Volume filtrado (L)}$$

O peso da biomassa corresponde à subtracção entre o peso das caixas de *Petri* com os filtros com biomassa seca e o peso das mesmas caixas de *Petri* com os filtros vazios.

Todo este procedimento foi realizado de igual modo, ao longo de 35 dias, para a determinação do crescimento em meio BG11. O crescimento foi analisado nos dois meios de modo a certificar em qual deles se obtinham valores mais interessantes.

#### **4.2.4. Análise matemática**

Os resultados finais foram normalizados. Foi calculada a taxa específica de crescimento e de duplicação, através de gráficos  $\ln (DO/DO_0)$  versus tempo. A taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), definida como o aumento da biomassa ou número de células por ml, num período de tempo específico, é o declive da linha de tendência, gerada no respectivo gráfico e o tempo de duplicação foi calculado usando a fórmula  $td = \ln 2/\mu$  (Ward, 1995 e Frias *et al.*, 1997).

### 4.3. Ensaios de produção de hidrogénio

#### 4.3.1. Preparação das culturas

Foram preparados reactores em cultura descontínua (*batch*), com meio BG11<sub>0</sub>, em duplicado com as quatro estirpes estudadas, selados com tampa de borracha, virados para baixo (evitando qualquer fuga de gás) (Figura 4.2). Os reactores, de 120 mL, continham 30 mL de cultura e 90 mL de fase gasosa (*headspace*). Foram incubados numa estufa P-SELECTA Hotcold-GL 2101507, a 25° C, com radiação incidente de 54  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ou 152  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , conforme o ensaio.

O meio que os reactores continham foi borbulhado com árgon durante 2 minutos, para eliminar o oxigénio atmosférico (impor condições de anaerobiose).

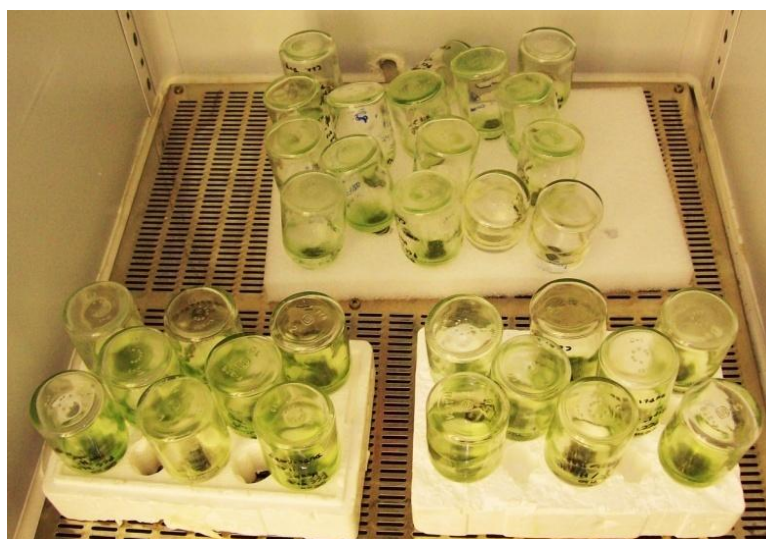


Figura 4. 2 – Reactores para a produção de H<sub>2</sub> pela *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes. Os reactores encontravam-se em posição inversa, numa estufa a 25° C, sujeitos a radiação de 54 ou 152  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  conforme o ensaio realizado.

#### 4.3.2. Determinação do teor em hidrogénio

A percentagem de hidrogénio produzido foi medido num Cromatógrafo gasoso, Varian CP3800 com um TCD (Detector de Condutividade Térmica) e um Porapack S (3m x 1/8”),

com azoto como gás de arraste. Este método está optimizado nas seguintes condições: injector a 60° C, detector a 150° C, temperatura inicial (durante os primeiros 3 minutos) da coluna 30°C e restantes 5 minutos de análise a 60° C. De cada frasco, foram retiradas diariamente, amostras duplicadas de 0,2 mL.

#### 4.3.3. Medição da DO correspondente

Em paralelo foram preparados reactores duplicados das mesmas estirpes, com densidades ópticas equivalente às densidades ópticas dos reactores para análise do H<sub>2</sub>, com o objectivo de determinar os seus crescimentos.

Deste modo, pôde-se extrapolar a taxa de produção de de hidrogénio em função de massa de clorofila, tendo em conta as condições de temperatura (25°C), pressão (1 atm) e volumes constantes do reactor e fase gasosa (*headspace*) assim como do meio de cultura:

$$\text{Produtividade de H}_2 \text{ (}\mu\text{mol H}_2\text{.mg Chl a}^{-1}\text{)} = \frac{\left[ \frac{\%H_2}{100} * \text{headspace} * 10^3 \right]}{V_{\text{cultura}} * [\text{chl.a}] * 24,44}$$

onde:

(%H<sub>2</sub>/100) – Quantidade de H<sub>2</sub> obtida (mL)

*headspace* – Volume da fase gasosa (mL)

V<sub>cultura</sub> – Volume da cultura (mL)

[Chl a] – Concentração da Clorofila a (mg/mL)

24,44 – Factor de conversão das condições PTN para 25° C

No âmbito deste projecto foram testados diversos parâmetros, numa tentativa de obter uma taxa de produção de hidrogénio máxima. Na presente dissertação são analisados os efeitos da continuidade *versus* descontinuidade da luz (ciclos de 16h luz/8h escuro) e de duas diferentes intensidades de luz contínua: 54 e 152 µE.m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.



## 5. Análise e discussão de resultados

De acordo com o desenvolvimento laboratorial efectuado durante cerca de 8 meses, foram obtidos resultados do crescimento e da produção de hidrogénio da *Anabaena* sp. PCC 7120 selvagem e de três mutantes: *hupL*<sup>-</sup>, *hoxH*<sup>-</sup> e *hupL*<sup>-</sup>/*hoxH*<sup>-</sup>. Os resultados obtidos permitiram comparar o crescimento em meio com e sem fonte de nitrato (BG11 e BG11<sub>0</sub> respectivamente) e o efeito de diversos parâmetros sobre a taxa de produção de hidrogénio.

A irreversibilidade das mutações genéticas foi assegurada, pois as culturas foram inoculadas em meio de cultura com o antibiótico a que possuem resistência, cresceram normalmente. Este era o resultado esperado de acordo com Masukawa *et al.* (2002b). É também de salientar que através das observações microscópicas não se verificou carga microbiana que indicasse contaminação.

### 5.1. Taxa específica de crescimento

Ao longo de vários dias (35 em meio BG11 e 42 em meio BG11<sub>0</sub>) foram feitas diversas análises de acordo com a metodologia apresentada, que permitiram o estudo do crescimento das 4 culturas. Cada uma partiu duma densidade óptica média de acordo com o Quadro 5.1.

Quadro 5. 1 - Densidade óptica média inicial, a 700 nm, para cada cultura.

Meio de cultura	Densidade média de cada cultura			
	Selvagem	<i>hupL</i> <sup>-</sup>	<i>hoxH</i> <sup>-</sup>	<i>hupL</i> <sup>-</sup> / <i>hoxH</i> <sup>-</sup>
BG11	0,02	0,03	0,03	0,04
BG11 <sub>0</sub>	0,08	0,1	0,1	0,1

Os gráficos da Figura 5.1 e 5.2 ilustram o crescimento em meio BG11 e meio BG11<sub>0</sub>, através da evolução da densidade óptica e peso seco normalizados. Em meio BG11 há uma fase de arranque muito acentuada mas uma fase de crescimento exponencial mais gradual. O oposto acontece quando as culturas se encontram em meio BG11<sub>0</sub>. As culturas atingiram valores de densidade óptica (Figura 5.1) e peso seco (Figura 5.2) mais elevados em meio BG11, apesar de curiosamente terem começado com valores de densidade óptica mais baixa. Por esta razão, pode-se extrapolar que as várias estirpes conseguem desenvolver mais biomassa quando se encontram num meio com azoto (neste caso nitrato), uma vez que este é um nutriente fundamental para o seu crescimento. Em meio BG11<sub>0</sub> as culturas foram estudadas durante mais 7 dias, verificando-se o início das fases estacionária ou de morte, fases essas que ainda não tinham sido atingidas pelas culturas em meio BG11.

Apesar de existir alguma padronização no crescimento das culturas, duma maneira geral foi a estirpe selvagem (Angermayr *et al.*, 2009) e a mutante *hupL*<sup>-</sup> que tiveram um maior crescimento, seguidas da dupla mutante (*hupL*<sup>-</sup>/*hoxH*) e por último a mutante *hoxH*<sup>-</sup>, facto que está de acordo com os resultados apresentados por Masukawa *et al.* (2002b). Uma possível explicação para que a mutante *hoxH*<sup>-</sup> tenha um crescimento inferior pode residir no facto de não estar ainda bem delineado o papel da enzima bi-direccional, podendo esta condicionar o próprio crescimento da cianobactéria (Angermayr *et al.*, 2009). Além disso, esta mutante apresentou algumas oscilações de crescimento, principalmente nos primeiros dias, e constatou-se que durante esse tempo a coloração da cultura atenuou-se (dados não apresentados), voltando a intensificar a sua cor alguns dias depois.

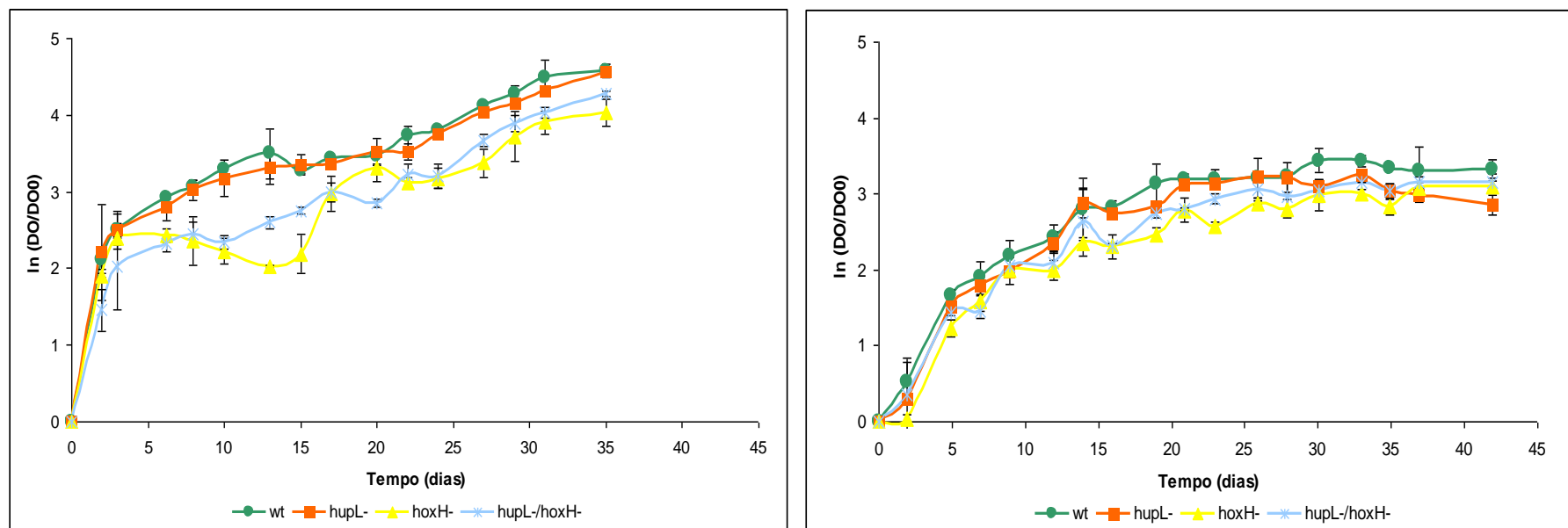


Figura 5. 1 - Curvas de crescimento da *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes em meio BG11 (à esquerda) e meio BG11<sub>0</sub> (à direita), da densidade óptica ( $\ln(DO/DO_0)$ ) a 700 nm em função do tempo. As curvas de cada estirpe foram obtidas a partir de experiências em duplicado. Os resultados representam a média e o respectivo desvio-padrão.

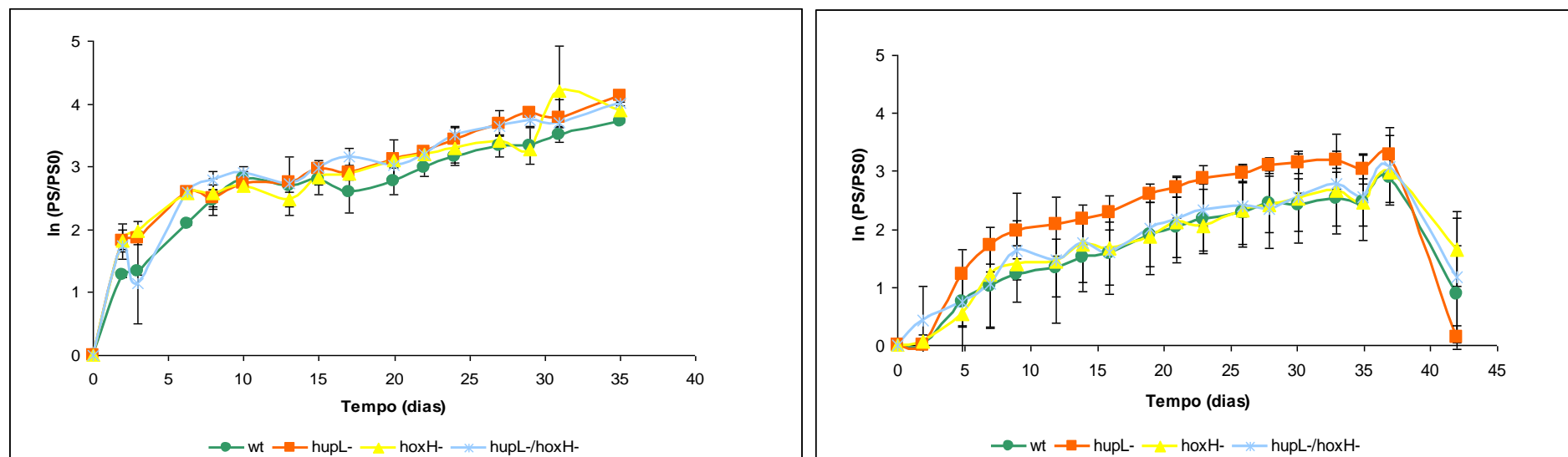


Figura 5. 2 – Evolução do peso seco da *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes em meio BG11 (à esquerda) e meio BG11<sub>0</sub> (à direita) em função do tempo. As curvas de cada estirpe foram obtidas a partir de experiências em duplicado. Os resultados representam a média e o respectivo desvio-padrão.

Partindo dos gráficos da evolução da densidade óptica, foi realizada uma análise das taxas específicas de crescimento das quatro estirpes. Foram focados dois períodos de tempo: do dia 1 ao dia 14 e do dia 14 ao dia 30. No meio BG11 verificou-se que, no primeiro intervalo de tempo, as taxas específicas de crescimento são mais baixas do que em meio BG11<sub>0</sub>. Durante este intervalo, a cultura *hoxH* teve uma taxa específica de crescimento negativa, ou seja, houve perda de biomassa. No segundo intervalo de tempo ocorreu o inverso, isto é, as culturas em meio BG11 mantiveram o seu crescimento, enquanto que em meio BG11<sub>0</sub> houve um decréscimo da taxa específica de crescimento pois, tal como é observado na Figura 5.1, neste meio, as culturas atingiram uma fase estacionária. As taxas específicas de crescimento e tempo de duplicação, calculadas de acordo com a metodologia apresentada no capítulo 37, estão presentes nos Quadros 5.2. e 5.3 e permitem corroborar as afirmações anteriores.

Duma maneira geral pode-se afirmar que as culturas crescem mais em meio com nitrato (BG11), atingindo maior valor de biomassa, apesar de inicialmente poderem ter um crescimento menos acentuado do que com meio BG11<sub>0</sub>. Contudo neste meio as culturas entram em fase estacionária mais rapidamente, o que não é interessante do ponto de vista de obtenção de biomassa para produção de hidrogénio.

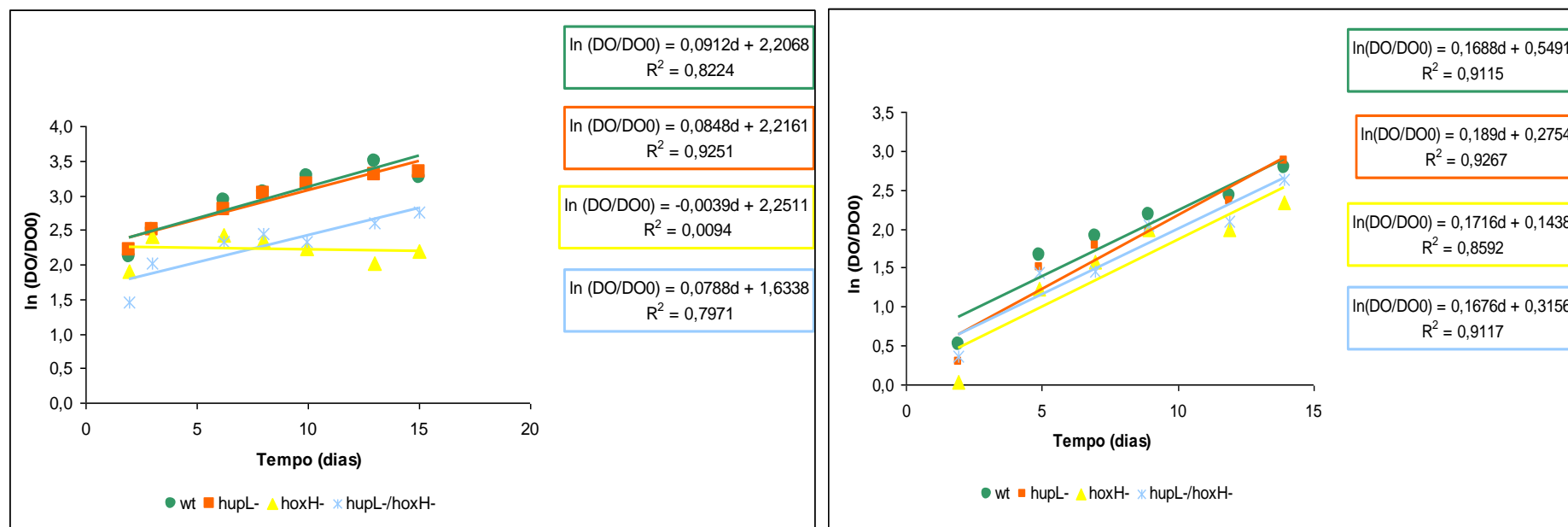


Figura 5. 3 – Representação do  $\ln(DO/DO_0)$  com  $\lambda = 700$  nm para determinação das taxas específicas de crescimento da *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes, em condições aeróbias, do dia 1 ao dia 14, em meio BG11 (à esquerda) e BG11<sub>0</sub> (à direita). T = 25° C; agitação orbital de 110 rpm e DO<sub>0</sub> correspondente à densidade óptica no tempo zero.

Outubro, 2009

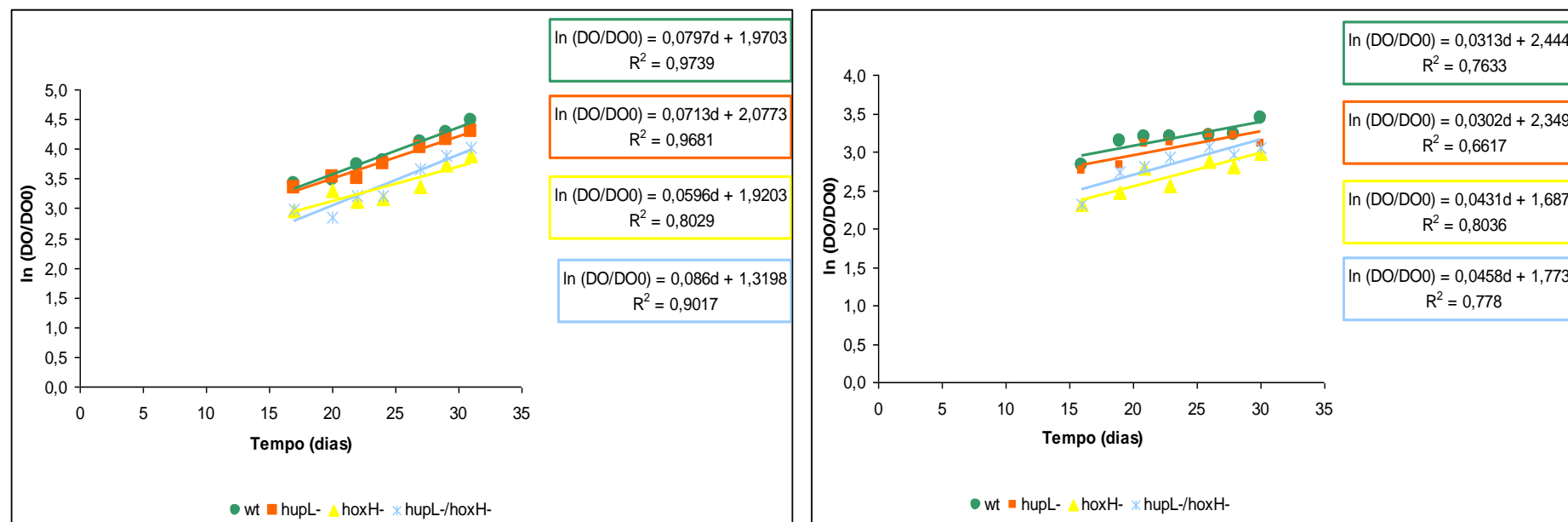


Figura 5. 4 – Representação do  $\ln(DO/DO_0)$  com  $\lambda = 700$  nm para determinação das taxas específicas de crescimento da *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes, em condições aeróbias, do dia 14 ao dia 30, em meio BG11 (à esquerda) e BG11<sub>0</sub> (à direita). T = 25° C; agitação orbital de 110 rpm e DO<sub>0</sub> correspondente à densidade óptica no tempo zero.

**Quadro 5. 2 – Taxa específica de crescimento e tempo de duplicação da *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes em meio BG11.**

		Dia 1 a dia 14		Dia 14 a dia 30	
Meio	Cultura	Taxa específica de crescimento (d <sup>-1</sup> )	Tempo de duplicação (dias)	Taxa específica de crescimento (d <sup>-1</sup> )	Tempo de duplicação (dias)
BG11	Selvagem	0,09	7,60	0,08	8,70
	<i>hupL</i> <sup>-</sup>	0,08	8,17	0,07	9,72
	<i>hoxH</i>	0,00	-177,73	0,06	11,63
	<i>hupL</i> <sup>-</sup> / <i>hoxH</i>	0,08	8,80	0,09	8,06

**Quadro 5. 3 - Taxa específica de crescimento e tempo de duplicação da *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes em meio BG11<sub>0</sub>.**

		Dia 1 a dia 14		Dia 14 a dia 30	
Meio	Cultura	Taxa específica de crescimento (d <sup>-1</sup> )	Tempo de duplicação (dias)	Taxa específica de crescimento (d <sup>-1</sup> )	Tempo de duplicação (dias)
BG11 <sub>0</sub>	Selvagem	0,17	4,11	0,03	22,15
	<i>hupL</i> <sup>-</sup>	0,19	3,67	0,03	22,95
	<i>hoxH</i>	0,17	4,04	0,04	16,08
	<i>hupL</i> <sup>-</sup> / <i>hoxH</i>	0,17	4,14	0,05	15,13



## 5.2. Ensaios de produção de hidrogénio

A luz comporta-se como a fonte energética capaz de desencadear os dois processos mais importantes deste estudo: a fotossíntese e a biofotólise directa. Deste modo, a presença ou ausência de luz pode induzir a inibição das hidrogenases (pela produção de  $O_2$  durante a fotossíntese), sendo tal facto mais relevante no caso da hidrogenase bi-direccional, mas pode também estimular a nitrogenase que requer ATP, igualmente produzido durante a fotossíntese. Por outro lado, a intensidade luminosa é relevante no sentido em que pode haver um desperdício fotónico ou mesmo uma foto-oxidação.

Os ensaios foram sempre feitos em meio BG11<sub>0</sub>, pois verificou-se que em meio BG11 não há produção de hidrogénio (dados não apresentados). Este facto advém da inibição para formação de heterocistos, pois numa atmosfera de árgon e num meio que contenha fonte de azoto, as cianobactérias não têm necessidade de captar azoto atmosférico, não diferenciando heterocistos e eliminando assim a contribuição fundamental da enzima nitrogenase.

Partindo destas premissas, foram estudados dois casos: a) regime de luz contínua e regime de luz descontínua; b) diferentes intensidades luminosas em regime de luz contínua. Para cada caso, as culturas partiram duma densidade óptica média de acordo com o Quadro 5.4.

Quadro 5. 4 - Densidade óptica média inicial para cada cultura.

Intensidade e ciclo ( $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ )	DO (700 nm)				DO Chl <i>a</i> (663 nm)			
	Selvagem	<i>hupL</i> <sup>-</sup>	<i>hoxH</i> <sup>-</sup>	<i>hupL</i> <sup>-</sup> / <i>hoxH</i> <sup>-</sup>	Selvagem	<i>hupL</i> <sup>-</sup>	<i>hoxH</i> <sup>-</sup>	<i>hupL</i> <sup>-</sup> / <i>hoxH</i> <sup>-</sup>
54	0,91	0,58	0,42	0,18	0,36	0,29	0,27	0,27
54 (16h luz/8h escuro)	0,44	0,18	0,28	0,44	0,10	0,09	0,07	0,13
152	0,31	0,37	0,34	0,41	0,15	0,18	0,12	0,16

Em ambas as situações a estirpe com maior taxa de produção de hidrogénio (volume de  $H_2$ /massa de clorofila/hora) foi a *hupL*<sup>-</sup>, seguida da dupla mutante *hupL*<sup>-</sup>/*hoxH*. A primeira, que carece da hidrogenase de assimilação (Hup), tal como o nome indica, não possui a principal enzima de consumo de hidrogénio, permitindo a acumulação do mesmo. Por outro lado, são passíveis de alguma discussão estes valores de produção tendo em conta que nesta cultura, está ainda presente a hidrogenase bi-direccional. Contudo, tendo em conta que a estirpe *hupL*<sup>-</sup>/*hoxH* tem uma produção inferior à *hupL*<sup>-</sup>, isto significa que o contributo da enzima bi-direccional é relevante, ou seja, que nestes ensaios esta enzima esteve mais activa enquanto produtora do que como consumidora de  $H_2$ .

Em terceiro lugar, a cultura *hoxH* esteve sempre com uma produção semelhante à estirpe selvagem. Neste caso, a enzima produtora – nitrogenase, foi fortemente contrabalançada pela enzima consumidora – hidrogenase de assimilação. Significa, portanto, que a ausência da enzima bi-direccional se reflecte numa perda elevada na produção de  $H_2$ .

Por último, no caso da estirpe selvagem, é notório que a produção de hidrogénio por parte da nitrogenase é severamente afectada pela hidrogenase de assimilação. Pode-se também verificar que, nesta situação o papel produtor da enzima bi-direccional é superado pelo consumo realizado pela mesma. A produção de hidrogénio pela estirpe selvagem revela que a ausência de qualquer mutação leva a uma produção ínfima de hidrogénio, sendo necessário portanto, recorrer à engenharia genética de modo a obter valores interessantes de produção.

Observa-se que a produção de hidrogénio tende a ser afectada ao fim de alguns dias (geralmente ao fim do 5º dia), o que poderá advir da concentração de oxigénio que se começa a acumular nos reactores. A presença desse gás implicaria uma inibição das hidrogenases induzindo a que a produção ficasse apenas sujeita ao contributo da nitrogenase. Neste caso, as curvas de produção de cada estirpe aproximar-se-iam da curva de produção da dupla mutante, onde apenas existe a enzima nitrogenase. Outro factor limitante poderá ser a falta de nutrientes pois os ensaios foram realizados em cultura descontínua (*batch*).

### 5.2.1. Regime de luz contínua e descontínua

A Figura 5.5 apresenta dois gráficos com a produção de hidrogénio em regime de luz contínua e luz descontínua.

Pode-se constatar, ao analisar a Figura 5.5, que, em todas as culturas, o efeito descontínuo da luz favoreceu a produção de hidrogénio. Tal como já referido, a estirpe mais produtora é a *hupL*<sup>-</sup>, seguida da *hupL*<sup>-</sup>/*hoxH*, depois da *hoxH* e finalmente encontra-se a estirpe selvagem como a menos produtora.

Em luz contínua, as culturas produziram um máximo de: *hupL*<sup>-</sup> - 8,2  $\mu\text{mol H}_2\cdot\text{mg Clh a}^{-1}\text{h}^{-1}$ , *hupL*<sup>-</sup>/*hoxH* - 3,9  $\mu\text{mol H}_2\cdot\text{mg Clh a}^{-1}\text{h}^{-1}$ , *hoxH* - 1,9  $\mu\text{mol H}_2\cdot\text{mg Clh a}^{-1}\text{h}^{-1}$  e a cultura *wild type* produziu um máximo de 0,9  $\mu\text{mol H}_2\cdot\text{mg Clh a}^{-1}\text{h}^{-1}$ .

Uma análise comparativa dos dois gráficos revela que as culturas, em ciclo descontínuo de luz produziram: *hupL*<sup>-</sup> 2,1 vezes mais, *hupL*<sup>-</sup>/*hoxH* 1,9 vezes mais, *hoxH* 1,5 vezes mais e *wild type* 1,1 vezes mais.

O efeito descontínuo da luz favorece a acção das hidrogenases, que não são afectadas pelo oxigénio durante a fase escura. Este facto é particularmente relevante no caso da hidrogenase bi-direccional que pôde assim contribuir e aliar-se à nitrogenase, para elevar a produção de  $\text{H}_2$  pela cultura *hupL*<sup>-</sup>.

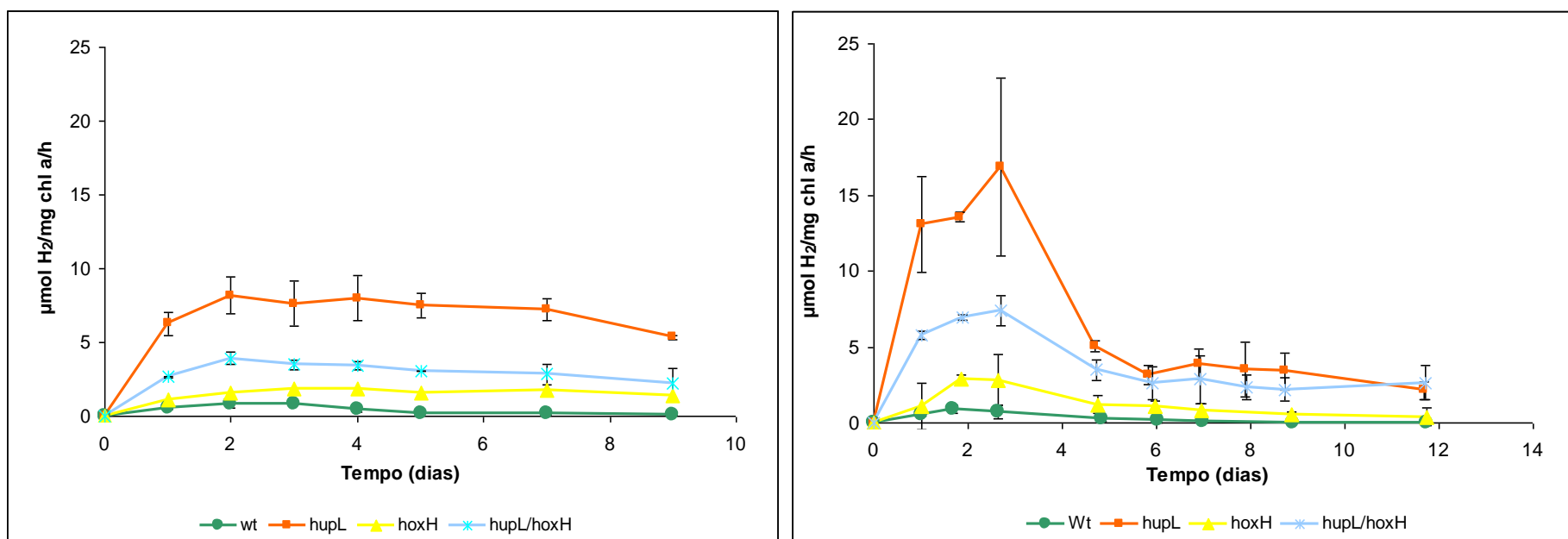


Figura 5. 5 - Produção de hidrogénio em reactores fechados pela *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes, em meio BG11<sub>0</sub>, em atmosfera de árgon sob radiação contínua (à esquerda) e descontínua: 16h luz/8h escuro (à direita), com intensidade luminosa de  $54 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . As curvas de cada estirpe foram obtidas a partir de experiências em duplicado. Os resultados representam a média e o respectivo desvio-padrão.

### 5.2.2. Regime de luz contínua com duas diferentes intensidades

A produção de  $H_2$  sob luz contínua mas a intensidades diferentes,  $54 \mu E.m^{-2}s^{-1}$  e  $152 \mu E.m^{-2}s^{-1}$  é apresentada na Figura 5.6. Uma análise comparativa dos dois gráficos permite concluir de imediato que o aumento da intensidade luminosa favoreceu a produção de hidrogénio. Neste caso, e tal como já referido, foi a estirpe *hupL*<sup>-</sup> aquela que obteve os resultados mais elevados.

Com intensidade luminosa de  $152 \mu E.m^{-2}s^{-1}$ , a mutante *hupL*<sup>-</sup> produziu cerca de  $20,1 \mu mol H_2.mg Clh a^{-1}h^{-1}$ , a mutante *hupL*<sup>-</sup>/*hoxH* obteve cerca de  $9,4 \mu mol H_2.mg Clh a^{-1}h^{-1}$ , a *hoxH* cerca de  $2,8 \mu mol H_2.mg Clh a^{-1}h^{-1}$  e a selvagem cerca de  $4,3 \mu mol H_2.mg Clh a^{-1}h^{-1}$ .

Estes valores são, respectivamente, 2,5, 2,4, 1,6 e 4,8 vezes superiores aos obtidos com a intensidade luminosa de  $54 \mu E.m^{-2}s^{-1}$ .

O valor bastante elevado da estirpe *wild type* tem por base os primeiros dias onde esta cultura conseguiu valores de produção de  $H_2$  inclusivamente maiores que a estirpe *hoxH*. Contudo, ao fim de 6 dias esta situação inverteu-se e a estirpe selvagem voltou a ter as produções de  $H_2$  mais baixas comparativamente a todas as outras culturas.

Neste ensaio com maior intensidade luminosa, as maiores produções registaram-se durante 10 dias, o dobro do ocorrido nos ensaios com luz descontínua, onde a fase de grande produção se registou nos primeiros 5 dias.

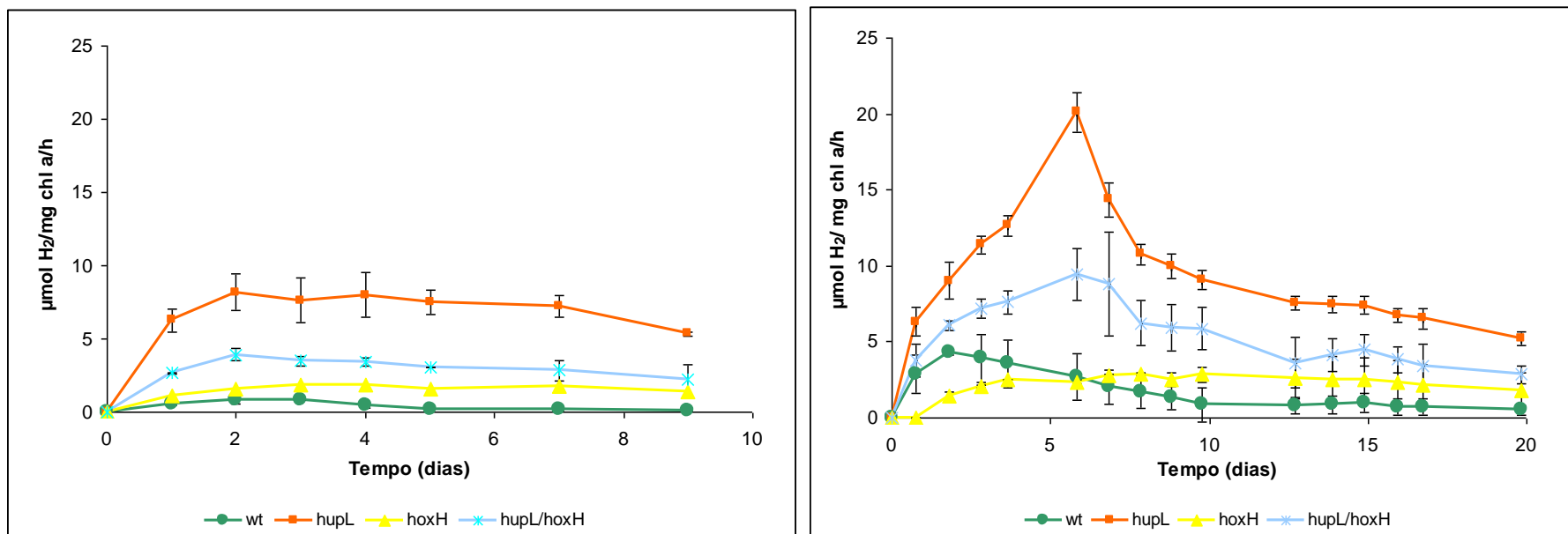


Figura 5. 6 - Produção de hidrogénio em reactores fechados pela *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes, em meio BG11<sub>0</sub> em atmosfera de árgon sob radiação contínua de intensidade luminosa de 54 μE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (à esquerda) e sob radiação contínua com intensidade de 152 μE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (à direita). As curvas de cada estirpe foram obtidas a partir de experiências em duplicado. Os resultados representam a média e o respectivo desvio-padrão.

## 6. Conclusões

Para que uma economia baseada no hidrogénio seja sustentável, será fundamental que as energias renováveis surjam como as principais produtoras deste gás. Um método de o produzir de forma biológica centra-se nas cianoactérias, que em condições fisiológicas específicas, são capazes de usar o poder redutor derivado da fotossíntese, para formar H<sub>2</sub> (Burgess, 2007).

Nos ensaios experimentais realizados pôde ser constatado o papel da engenharia genética uma vez que a cianobactéria estudada – *Anabaena* sp. PCC 7120 obteve maiores taxas de produção através da mutante *hupL*<sup>-</sup>, deficiente na enzima de assimilação.

Das situações estudadas, as produções mais elevadas verificaram-se na situação de luz contínua com intensidade luminosa de 152  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Comparando o regime luz contínua com o regime de ciclos de luz descontínua (dia/noite), verifica-se que o segundo induz maior produção, o que leva a crer que este regime, aliado a uma intensidade luminosa elevada, possa levar a taxas de produção de hidrogénio ainda maiores do que as actuais.

É de salientar que, antes de serem inseridas em fotobioreactores para produzir H<sub>2</sub>, as culturas devem, previamente crescer em meio BG11, pois foi comprovado que é neste meio que as culturas atingem maiores teores em biomassa. Podem ser depois centrifugadas e inseridas em fotobioreactores com meio BG11<sub>0</sub>.

Aliando os conhecimentos práticos obtidos, pode-se estipular uma estratégia de produção que vai de encontro aos objectivos definidos de maximizar a produção de hidrogénio pela cianobactéria *Anabaena* sp. PCC 7120: crescimento em meio BG11, posterior passagem para meio BG11<sub>0</sub> para produção de H<sub>2</sub>, regime de luz descontínuo, com intensidade luminosa máxima.

Todavia, como estas produções não são ainda interessantes à escala industrial, é necessário aprofundar a investigação numa tentativa de superar as diversas limitações,

entre elas: condições de cultura (adição de certos elementos como CO<sub>2</sub>, optimização de parâmetros como o regime e intensidade luminosa), micorganismos mais eficientes e menos sensíveis ao oxigénio, desenho de bioreactores mais acessíveis e mais adaptados à problemática da separação dos gases.

Há também que ter em conta que esta dissertação estudou apenas uma cianobactéria, sendo do conhecimento geral que somente uma pequena fracção de micorganismos foi até agora descoberta, logo outras pesquisas devem continuar a ser feitas no sentido de descobrir outros micorganismos possivelmente capazes de maiores produções de hidrogénio.



## 7. Bibliografia

Ahmann, D. e Dorgan, J. (2007). *Bioengineering for Pollution Prevention*. U.S. Environmental Protection Agency – EPA. Acedido a 20 de Julho em <http://www.epa.gov/ncer/publications/statesci/bioengineering.pdf>.

Amos, W., (2004). *Updated Cost Analysis of Photobiological Hydrogen Production from Chlamydomonas reinhardtii Green Algae*. Milestone Completion Report. National Renewable Energy Laboratory – NREL. Acedido em 20/07/09 em: <http://www.nrel.gov/docs/fy04osti/35593.pdf>.

Angermayr, S., Hellingwerf, K., Lindblad, P., Mattos, M., (2009). Energy biotechnology with cianobactéria. *Current Opinion in Biotechnology*. **20**:257–263.

Appel, J., Phunpruch, S., Steinmüller, K., Schulz, R., (2000). The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Archives of Microbiology*. **173**: 333-338.

Balat, M., (2009). Possible Methods for Hydrogen Production. *Energy sources, Part A*. **21**: 39-50.

Benemann, J. (1998) *Process analysis and economics of biophotolysis of water. A preliminary assessment*. Report to the International Energy Agency Hydrogen Program, Subtask B, Annex 10. Acedido em: 28/07/09, em: [http://www.ieahia.org/pdfs/Report\\_John\\_Benneman\\_Task%2010\\_Process\\_Analysis\\_and\\_Economics\\_of\\_Biophotolysis\\_of\\_H2O.pdf](http://www.ieahia.org/pdfs/Report_John_Benneman_Task%2010_Process_Analysis_and_Economics_of_Biophotolysis_of_H2O.pdf).

Benemann, J. (2000). Hydrogen production by microalgae. *Journal of Applied Phycology*. **12**: 291 – 300.

Berman-Frank, I., Quigg, A., Finkel, Z., Irwin, A., Haramaty, L. (2007). Nitrogen-fixation strategies and Fe requirements in cyanobacteria. *Limnology and Oceanography*. **52(5)**: 2260-2269.

Burgess, G. e Fernández-Velasco, J., (2007). Materials, operational energy inputs and net energy ratio for photobiological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. **32**: 1225-1234.

Carrasco, C., Buettner, J., Golden, J. (1995). Programmed DNA rearrangement of a cyanobacterial hupL gene in heterocysts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **92**: 791-795.

Das, D. e Veziroglu, T.N., (2001). Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*. **26**: 13-28.

DPPRI – Departamento de Prospectiva e Planeamento e Relações Internacionais (2007). *Ambiente, Inovação e Competitividade da Economia*. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Lisboa.

Frias, J., Flores, E., Herrero, A., (1997). Nitrate Assimilation Gene Cluster from the Heterocyst-Forming Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology*. **179**: 477-486.

- Gaffron, H. e Rubin, K., (1942). Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *Journal of General Physiology*. **26**: 219-240.
- Gao, K., Yu, H., Brown, M., (2007). Solar PAR and UV radiation affects the physiology and morphology of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. **89**: 117-124.
- Golden, J. e Yoon, H-S., (2003). Heterocyst development in *Anabaena*. *Current Opinion in Microbiology*. **6**: 557-563.
- Hallenbeck, P. e Benemann, J., (2002). Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*. **27**: 1185-1193.
- Heidorn, T. e Lidblad, P., (2006). Heterologous expression of an algal hydrogenase in a heterocystous cyanobacterium. Acedido a 27/07/09 em: <http://www.cder.dz/A2H2/Medias/Download/Proc%20PDF/PARALLEL%20SESSIONS/%5BS09%5D%20Production%20-%20Algae/15-06-06/258.pdf>
- Houghton, J., Ding, Y., Griggs, D., Noguer, M., Van der Linden, P., Dai, X., Maskell, K., Johnson, C., (2001). *Climate Change 2001. The Scientific Basis*. Cambridge, New York: Cambridge University Press. Acedido a 10/07/09 em: [http://www.grida.no/publications/other/ipcc\\_tar/?src=/climate/ipcc\\_tar/wg1/372.htm](http://www.grida.no/publications/other/ipcc_tar/?src=/climate/ipcc_tar/wg1/372.htm)
- IME – Institution of Mechanical Engineers (2009). *Geo- Engineering Giving us the time to act?*. Institution of Mechanical Engineers. Acedido a 10/10/09 em: <http://www.imeche.org/NR/rdonlyres/448C8083-F00D-426B-B086-565AA17CB703/0/IMechEGeoengineeringReport.pdf>.
- Joliot, P., e Joliot A., (2002). Cyclic electron transfer in plant leaf. Acedido a 2/08/09, em: [http://www.ibpc.fr/UMR7141/web\\_lab/2002/Joliot02.pdf](http://www.ibpc.fr/UMR7141/web_lab/2002/Joliot02.pdf).
- Kang, R., Shi, D., Cong, W., Cai, Z., Ouyang, F., (2005). Regulation of CO<sub>2</sub> on heterocysts differentiation and nitrate uptake in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Journal of Applied Microbiology*. **98**: 693-698.
- Kerby, N., Niven G., Rowell P., Stewart W., (1987). Ammonia and Amino Acid Production by Cyanobacteria. *Algal biotechnology*, T. Stadler, J. Mollion, M.-C. Verdu, Y. Karamanos, H. Morvan, and D. Christiaen (Eds.), Elsevier Applied Science, London, pp. 277-286.
- Kok, B. (1953). Pilot-Plant studies in the production of *Chlorella*. *Algal culture: from laboratory to pilot plant*, Burlew, J. (Ed.), Carnegie Institute of Washington, pp. 235-272. Acedido a 10/09/09 em [http://www.ciw.edu/publications\\_online/algal\\_culture.pdf](http://www.ciw.edu/publications_online/algal_culture.pdf).
- Lesser, M., (2008). Effects of ultraviolet radiation on productivity and nitrogen fixation in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. (Newton's strain). *Hydrobiologia*. **598**: 1-9.
- Levin, D., Pitt, L., Love, M., (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*. **29**: 173-185.
- Lindblad, P., Christensson, K., Lindberg, P., Fedorov, A., Pinto, F., Tsygankov, A., (2002). Photoproduction of H<sub>2</sub> by wildtype *Anabaena* sp. PCC 7120 and a hydrogen uptake deficient mutant: from laboratory experiments to outdoor culture. *International Journal of Hydrogen energy*. **27**: 1271-1281.

- Madamwar D., Garg N., Shah V. (2000). Cyanobacterial hydrogen production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **16**: 757-767.
- Masukawa, H., Mochimaru M., Sakurai H., (2002a). Hydrogenases and photobiological hydrogen production utilizing nitrogenase system in cyanobacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*. **27**: 1471-1474.
- Masukawa, H., Mochimaru M., Sakurai H., (2002b). Disruption of the uptake hydrogenase gene, but not of the bidirectional hydrogenase gene, leads to enhanced photobiological hydrogen production by the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Applied Microbiology Biotechnology*. **58**: 618-624.
- Meeks J., Castenholz R., (1971). Growth and photosynthesis in an extreme thermophile *Synechococcus lividus* (Cyanophyta). *Archives of Microbiology*. **78**:25-41.
- Moslavac, S., (2007). Outer membrane proteins of *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians – Universität München, München. 150 pp.
- Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K., Endo, T., Tasaka, M., Shikanai, T., (2004). Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature*. **429**: 579-582.
- Mussgnug, J., Thomas-Hall, S., Rupprecht, J., Foo, A., Klassen, V., McDowall, A., Schenk, P., Kruse, O., Hankamer, B., (2007). Engineering photosynthetic light capture: Impacts on improved solar energy to biomass conversion. *Plant Biotechnology Journal*. **5**:802–814.
- Nakajima, Y. e Ueda, R., (2000). The effect of reducing light-harvesting pigment on marine microalgal productivity. *Journal of Applied Phycology*. **12**: 285–290.
- Owens, G. (2002). *Best Practices Guide: Economic & Financial Evaluation of Renewable Energy Projects*. Acedido em 17 de Novembro de 2008, em: <http://www.iie.org/programs/energy/pdfs/Econ%20Finacial%20Eval%20of%20Renewable%20Energy%20Projects.pdf>
- Pohl, P., Kohlase M., Martin M. (1987). Photobioreactors for the axenic mass cultivation of microalgae. *Algal Biotechnology*, Stadler T., Mollion J., Verdus M.-C., Karamanos Y., Morvan H., Christian D. (Eds.), Elsevier Applied Science. France, pp. 209-217.
- Polle, W., Kanakagiri, S., Jin, E., Masuda, T., Melis, A. (2002) Truncated chlorophyll antenna size of the photosystems - a practical method to improve microalgal productivity and hydrogen production in mass culture. *International Association for Hydrogen Energy*. **27**:1257–1264.
- Postgate, J., (1998). *Nitrogen Fixation*. 3ª Edição, Cambridge University Press. Cambridge.
- Prince R. e Kheshgi H. (2005). The photobiological production of Hydrogen: Potential Efficiency and Effectiveness as a Renewable Fuel. *Critical Reviews in Microbiology*. **31**: 19-31.
- Rai, A. e Tiwari, S. (1999). Mutants of the Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 Altered in Nitrate Trasnport and Reduction. *Current Microbiology*. **39**: 237-243.
- Santos F. e Santos F. (2004). O combustível Hidrogênio. Acedido em 15/01/09, em: <http://www.ipv.pt/millennium/Millennium31/15.pdf>.

Schenk, P., Thomas-Hall, S., Stephens, E., Marx, U., Mussgnug, J., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B., (2008). Second generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Research*. **1**: 20-43.

Schindler, J., Wurster, R., Zerta, M., Landinger, H., Blandow, V., Weindorf W., Zittel, W. (2006). *Where will the Energy for Hydrogen Production come from? -Status and Alternatives*. Acedido em: 05/08/09, em: <http://www.h2euro.org/>.

Schindler, J., Wurster, R., Zerta, M., Landinger, H., Schmidt, P., Weindorf, W., Blandow, V. (2008). *Hydrogen and Fuel Cell as strong partners of Renewable Energy Systems*. Acedido em: 11/01/09, em: <http://www.h2euro.org/>.

Schopf, J., (2000). The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage. *The ecology of cianobactéria*, B. Whitton e M. Potts (Eds.), Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, pp. 13-32.

Schmitz, O., Boison, G., Hilsher, R., Hundeshagen, B., Zimmer, W., Lottspeich, F., Bothe, H., (1995). Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cianobactéria. *European Journal Biochemistry*. **233**: 266-276.

Schmitz, O. e Bothe, H., (1996). The Diaphorase Subunit HoxU of the Bidirectional Hydrogenase as Electron Transferring Protein in Cyanobacterial Respiration?. *Naturwissenschaften*. **83**: 525-527.

Serebriakova, L., Zorin, N., Lindblad, P., (1994). Reversible hydrogenase in *Anabaena variabilis* ATCC 29413. Presence and localization in non-N<sub>2</sub>-fixing cells. *Archives Microbiology*. **161**: 140-144.

Spalaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., and Isambert, A., (2006). Commercial applications of Microalgae- review. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **101**: 87-96.

Spormann, A., Swartz, J., Wing-On, J., (2006). Metabolic Engineering of Hydrogen Production in Cyanobacterial Heterocysts, GCEP. Acedido em 27/07/09 em: [http://gcep.stanford.edu/pdfs/ib0KJnlw5S-8G1RS8EqnPg/spormann\\_web.pdf](http://gcep.stanford.edu/pdfs/ib0KJnlw5S-8G1RS8EqnPg/spormann_web.pdf).

Stal, L., (2000). Cyanobacterial Mats and Stromatolites. *The ecology of cyanobacteria*, B. Whitton e M. Potts (Eds.), Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, pp. 61-120.

Swartz, J., Stapleton, J., Kuchenreuther, J., Smith, P., (2008). Direct Solar Biohydrogen: Part II Annual Report – June 2007 to May 2008, GCEP. Acedido em 27/07/09 em: [http://gcep.stanford.edu/pdfs/ryhz9TjH9TbEp9qJ290tWQ/2.1.2\\_swartz\\_2008\\_web.pdf](http://gcep.stanford.edu/pdfs/ryhz9TjH9TbEp9qJ290tWQ/2.1.2_swartz_2008_web.pdf).

Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wunschiers, R., Lindblad, P. (2002). Hydrogenases and Hydrogen Metabolism of Cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **66**: 1-20.

Ward, G., (1995). Saltwater Tests. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*, 2ª edição, G. Rand (Ed.), Taylor & Francis Inc, pp. 103-131.

Ward, D. e Castenholz, R., (2000). Cyanobacteria in Geothermal Habitats. *The ecology of cyanobacteria*, B. Whitton e M. Potts (Eds.), Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, pp. 37-59.

Yu, J. e Takahashi, P. (2007). Biophotolysis-based Hydrogen Production by Cyanobacteria and Green Microalgae. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, A. Méndez-Vilas (Ed.), Formatex, pp. 79-88.

Recursos online:

Cyanobacteria

URL: <http://tolweb.org/Cyanobacteria/2290> (03/08/09)

Ecole Polytechnique: DGAE

URL: <http://www.enseignement.polytechnique.fr/profs/biochimie/Alfonso.Jaramillo/BioModularH2/index.php/> (02/08/09)

Environmental Chemistry.com

URL : <http://environmentalchemistry.com/yogi/periodic/H.html> (20/08/09)

European Science Foundation

URL: [www.cost.esf.org](http://www.cost.esf.org) (30/04/09)

International Energy Agency

URL: [http://www.iea.org/Textbase/stats/countryresults.asp?COUNTRY\\_CODE=PT&Submit=Submit](http://www.iea.org/Textbase/stats/countryresults.asp?COUNTRY_CODE=PT&Submit=Submit) (12/08/09)

Internet Archive:

URL:

[http://www.archive.org/stream/minnesotabotpt103macmrich/minnesotabotpt103macmrich\\_djvu.txt](http://www.archive.org/stream/minnesotabotpt103macmrich/minnesotabotpt103macmrich_djvu.txt) (30/06/09)

Hydrogen Data

URL: <http://www.h2data.de/> (18/04/09)

Introduction to drug action

URL: <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/654antibiotic.html> (18/09/09)

Phylum Cyanobacteria

URL: [http://www.keweenawalgae.mtu.edu/ALGAL\\_PAGES/cyanobacteria.htm](http://www.keweenawalgae.mtu.edu/ALGAL_PAGES/cyanobacteria.htm) (10/06/09)

United Nation Environment Programme

URL: <http://www.unep.or.jp/ietc/Publications/INSIGHT/Fal-96/9.asp> (16/09/09)

United States Department of Energy

URL: [http://www1.eere.energy.gov/hydrogenandfuelcells/news\\_cost\\_goal.html](http://www1.eere.energy.gov/hydrogenandfuelcells/news_cost_goal.html) (05/08/09).